Über den

Einfluß günstiger Temperaturen auf gefrorene Schimmelpilze.

(Zur Kenntnis der Kälteresistenz von *Aspergillus niger*.)

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

VORGELEGT VON

JOHANNES LINDNER

AUS ALTENBURG (SACHS.-ALT.)

MIT 10 TEXTABBILDUNGEN.

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1914

Über den

Einfluß günstiger Temperaturen auf gefrorene Schimmelpilze.

(Zur Kenntnis der Kälteresistenz von *Aspergillus niger*.)

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT LEIPZIG

VORGELEGT VON

JOHANNES LINDNER

AUS ALTENBURG (SACHS.-ALT.)

MIT 10 TEXTABBILDUNGEN.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1914

Angenommen von der III. Sektion auf Grund der Gutachten der Herren Pfeffer und Woltereck.

Leipzig, den 21. Juli 1914.

Der Procancellar.
Kirchner.

Separatabdruck
aus den Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik, Band LV, Heft 1.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Inhalts-Verzeichnis.

Seite

Einleitung 1

I. Teil. Die Desorganisationsvorgänge im Mycel von *Aspergillus niger* nach dem Gefrieren 5

A. Methodik für die Beobachtung der Desorganisation 5

B. Beobachtung der Desorganisation im *Aspergillus*-Mycel nach Einwirkung von Kälte 8

I. Verlauf der Desorganisation in submersen Mycelien bei Eisbildung 8

II. Verlauf der Desorganisation in submersen Mycelien von *Aspergillus niger* bei Vermeidung der Eisbildung . . 14

III. Beobachtung der Desorganisation in Lufthyphen von *Aspergillus niger* 17

C. Das Verhalten der resistenten *Aspergillus*-Zellen 22

I. Die Temperaturbedingungen für die Lebensfähigkeit der resistenten Zellen 22

II. Die Lebensdauer der resistenten *Aspergillus*-Zellen in ungünstigen Temperaturbedingungen 24

III. Einfluß von wiederholtem Gefrieren auf die resistenten Zellen 25

IV. Die Bedingungen für die Bildung der resistenten Zellen 28

D. Versuche mit *Penicillium glaucum*, *Phycomyces nitens* und *Rhizopus nigricans* 31

II. Teil. Der Atmungsvorgang im Mycel von *Aspergillus niger* nach dem Gefrieren 33

A. Methodik 34

B. Verlauf der Atmung im *Aspergillus*-Mycel nach Einwirkung von Kälte 39

Zusammenfassung einiger Ergebnisse 49

Literatur-Verzeichnis 51

Einleitung.

Jede Zelle ist in ihrer Lebensdauer begrenzt. Die Ursachen für das Absterben mögen nun innere sein, wie sie im Verlaufe der Ontogenese selbstregulatorisch wirken, oder äußere, wie sie durch Einflüsse mechanischer oder chemischer Natur gegeben sind, jedenfalls tritt der Tod ein, wenn die Harmonie der Partialfunktionen des Plasmas zu weitgehend gestört wird (Pfeffer 1904, II, S. 282). In den meisten Fällen ist mit dem Absterben der Zelle eine auch mikroskopisch nachweisbare Desorganisation des protoplasmatischen Inhaltes verbunden, deren Verlauf zum Teil verfolgt werden konnte. Versuche haben ergeben, daß die Desorganisationserscheinungen in gleicher Weise eintreten, wenn die Zelle künstlich in ihrer Lebenstätigkeit beeinflußt wird, und daß das Resultat von der Dauer der Einwirkung der ungünstigen Bedingungen abhängt. Zugleich zeigen diese Beobachtungen, daß sich das Protoplasma abnormen Außenbedingungen nur in gewissen Grenzen anpassen kann.

Eingehende Untersuchungen über die Natur der Desorganisationserscheinungen der Zelle im allgemeinen stammen von Klemm (1895). Dieser Forscher unterschied folgende drei Typen der Desorganisation (1895, S. 691): Kollaps, Konfigurationsänderungen und Veränderungen im Innern des Protoplasmas. Der Kollaps des Protoplasten, das unregelmäßige Zurückweichen von der Zellwand, stets mit dem Schwinden des Turgors verbunden, ist das sicherste Zeichen des eingetretenen Todes und ist deshalb irreparabel (Klemm, 1895, S. 674). Andererseits ist der Eintritt des Kollaps ein Indizium

für eine allmähliche Wirkung und eine zunächst relativ geringere Schädlichkeit des Desorganisationsmittels, da dem Protoplasma noch für längere Zeit die Bewegungsmöglichkeit erhalten bleibt. — Anders verhält es sich bei den Konfigurationsänderungen, die durch verschiedene Agentien bewirkt werden. Es handelt sich hierbei nach Klemm um „Formumwälzungen, bei denen das Protoplasma nicht eine passive, sondern mehr aktive Rolle spielt (1895, S. 676)". „Sie sind bis zu einem gewissen Grade Erfolge des plötzlichen Wechsels". Die Beispiele von Einwirkung höherer Temperaturen lehren aber, daß hierdurch hervorgerufene Deformationen sich vielfach ausgleichen können. Der ursprüngliche Zustand wird allerdings nur dann hergestellt, wenn die schädliche Temperatur nicht zu lange einwirkt (Klemm, S. 639). Dies gilt sowohl für hohe Wärmegrade, als auch für Temperaturen unter 0°. Endlich seien noch die Veränderungen im Innern des Protoplasmas erwähnt. Klemm faßt sie in zwei Gruppen zusammen (S. 681): Granulationen (Fällungserscheinungen) und Vakuolisierung (Lösungserscheinungen).

Die Desorganisation ist demnach in erster Linie abhängig von der Schädlichkeit des Desorganisationsmittels, sowie von der Plötzlichkeit und Dauer der Einwirkung. Der Zeitfaktor hat einen Hauptanteil am Endergebnis (Klemm, S. 694). Diese letzte Tatsache ist deswegen von großer Bedeutung, weil sie uns zeigt, daß die Zelle nicht sofort den geänderten Lebensbedingungen zum Opfer fällt, sondern vielmehr die Fähigkeit besitzt, ungünstigen Einflüssen für bestimmste Zeiträume zu widerstehen. Solche Einflüsse sind ja in der Natur in mannigfacher Weise gegeben und werden von der pflanzlichen Zelle mit mehr oder weniger Erfolg ertragen. So ist dem Protoplasten u. a. ein gewisses Anpassungsvermögen an häufig eintretende Temperaturschwankungen eigen. Doch gilt dies nur für ein bestimmtes für jede Pflanze spezifisches Temperaturintervall. Um der todbringenden Wirkung tieferer Temperaturen, wie sie z. B. die periodisch eintretende Winterkälte mit sich bringt, zu widerstehen, werden deshalb vielfach von seiten der Pflanzenzelle weitgehende Veränderungen im Protoplasma vorgenommen. Solche Veränderungen in den Zellen vieler pflanzlicher Gewebe beim Nahen der kälteren Jahreszeit sind aus zahlreichen Beobachtungen bekannt. Ich erwähne hier die Arbeiten von Müller-Thurgau (1882), A. Fischer (1891) und Lidforss (1907). Lidforss z. B. stellte fest (1907, S. 12—29), daß in den ca. 130 von

ihm untersuchten Gefäßpflanzen eine Überführung der Stärke in Zucker stattfindet. Hierdurch wird die Konzentration des Zellsaftes und zugleich die osmotische Leistung erhöht (1907, S. 66 bis 68). Damit sollte der Pflanze zugleich ein Mittel gegeben sein, die Kälteresistenz zu steigern. Spätere Untersuchungen von Bartetzko (1910) und Maximow (1912) konnten diese Annahme zum Teil bestätigen. Genannte Forscher erreichten in der Tat eine Erhöhung der Kälteresistenz ihrer Versuchsobjekte, wenn sie diese verschiedenen Einflüssen aussetzten, die z. T. eine Turgorsteigerung in der Zelle zur Folge hatten. Sie wiesen aber zugleich nach, daß zwischen Erhöhung der osmotischen Leistung und der Erhöhung der Kälteresistenz kein einfaches Verhältnis besteht, sondern daß die Resistenz bedeutend rascher wächst (Bartetzko, 1910, S. 74, Maximow, 1912, S. 57).

Da in der Natur die Bildung und Ansammlung gewisser „Schutzstoffe", z. B. des Zuckers, gleichfalls die Kälteresistenz erhöhen kann, so ist es nicht zu verwundern, daß bei ungleicher Verteilung solcher die Resistenz bedingenden Stoffe sowohl der osmotische Wert, als auch die Kälteresistenz in den einzelnen Zellkomplexen eines pflanzlichen Organismus differieren kann. Hierin mag zuweilen auch der Grund dafür liegen, daß embryonales Gewebe vielfach kälteresistenter ist, als das ältere Gewebe. Apelt (1907, S. 249) machte diese Beobachtung an Kartoffeltrieben. Wir treffen hier den Fall, daß die Zellen der Gipfelteile der Triebe vor einer Schädigung durch Kälte bewahrt bleiben, während die basalen Teile der Triebe erfrieren. Ebenso konnte Irmscher (1912, S. 422) feststellen, daß bei den Laubmoosen einzelne z. T. embryonale Zellkomplexe eine größere Kälteresistenz besitzen. Aber auch bei weniger differenzierten Organismen, bei den Algen und Pilzen, ist der Kältewiderstand der einzelnen Zellen verschieden. So beobachtete Bartetzko (1910, S. 86) in den älteren Mycelien des *Aspergillus niger* Zellen, die nach dem Gefrieren noch ihr normales Aussehen hatten. Weiter teilt Schumacher (1875, S. 186) mit, daß jüngere, oft noch vakuolenfreie Hefezellen *(Saccharomyces cerevisiae)* nach dem Gefrieren leben bleiben und den Ausgangspunkt für neue Generationen bilden. Schließlich sei noch Wislouch[1]) erwähnt, der bei der Alge *Sticho-*

1) Wislouch, Über das Ausfrieren der Alge *Stichococcus bacillaris*. Referiert im Zentralbl. f. Bakteriol., II. Abt., Bd. 30, S. 309.

coccus bacillaris kälteresistente Zellen fand, die nach dem Gefrieren lebensfähig blieben.

Bei den eben angeführten Untersuchungen von Bartetzko galten das Nichteintreten der Plasmolyse und die Färbbarkeit des Protoplasten mit Anilinblau als Zeichen für den eingetretenen Tod, wenn er nicht schon durch den Kollaps des Zellinhaltes angezeigt war. Denn Kollaps ist ja nach Klemm ein untrügliches Zeichen für den mit dem Verluste des Turgors verbundenen Tod. Dieselbe Ansicht vertritt auch Schumacher (1875, S. 186), der die gleichen Beobachtungen der Desorganisation an Hefezellen machte.

Unter Berücksichtigung dieser übereinstimmenden Erfahrungen über den irreparablen Zustand der nach dem Gefrieren turgeszenzlosen Zelle mußte eine kurze Mitteilung von A. Richter (1910) befremden. Nach der Ansicht dieses Forschers ist das Nichteintreten der Plasmolyse und die Färbbarkeit des Zellinhaltes im gefrorenen *Aspergillus*-Mycel für den Kältetod der Zellen nicht das sichere Kriterium, das man bisher darin sah. Vielmehr sollen sich die Hyphen sofort nach dem Gefrieren nur in einem Schwächezustand befinden, aus dem sie durch optimale Temperatur befreit werden können. Es ginge demnach im gefrorenen Mycel die Grenze zwischen Leben und Tod verloren. Wird das Mycel, das nach dem Auftauen färbbar ist und keine Plasmolyse zeigt — also die Turgeszenz verloren hat —, auf optimale Temperatur (+ 30° C) gebracht, so lebe es wieder auf und wachse weiter. Zu dieser Folgerung wurde Richter durch die Beobachtung der Atmungsintensität des Mycels nach der Kälteperiode veranlaßt. Die Atmung stieg in mäßig langer Zeit weit über die zuvor erreichte Größe. Die naheliegende Vermutung, daß dieser Erfolg auf Rechnung eines sich neu entwickelnden Mycels zu setzen sei, wie es aus nachträglich auskeimenden Sporen oder einzelnen überlebenden Zellen herstammen könnte, weist Richter zurück, da sich die Atmung schneller steigere, als dies allein durch Zuwachs von einigen Zellen aus geschehen könne. Sollte Richters Deutung seiner Versuchsergebnisse zutreffen, so dürften wir in der Tat in dem Verluste der Plasmolysierbarkeit, d. h. in dem Verluste des Turgors, einerseits und in der Färbbarkeit des Protoplasmas andererseits nicht mehr sichere Kriterien des „Todes“ sehen; oder aber wir hätten es, „wenn die Unterbrechung der Lebensreaktion als physiologischer Tod angesehen wird“, „hier wie dort mit der Wiederbelebung eines toten organischen Substrates zu tun“ (1910, S. 624).

Richters Schlußfolgerungen, die eine gewisse Erweiterung unseres Vorstellungskreises über die Lebensvorgänge bedeuten würden, stehen nun aber im Widerspruch zu den Ergebnissen aller früheren Untersuchungen, und einige naheliegende Fehlerquellen scheinen, soweit dies aus der kurzen Mitteilung geschlossen werden kann, nicht genügend berücksichtigt worden zu sein, so daß seine Ausführungen keineswegs überzeugend wirken.

Es war meine Aufgabe, zu versuchen, die sich hier darbietenden Widersprüche aufzuklären und das Verhalten der Schimmelpilze unter den in Rede stehenden Bedingungen einer Prüfung zu unterziehen. Zu diesem Zwecke beobachtete ich bei Schimmelpilzen, besonders bei *Aspergillus niger*, doch auch bei einigen anderen Arten:

1. den Verlauf der Desorganisation in den Hyphen nach dem Gefrieren;
2. den Einfluß der Temperatur auf die Desorganisationserscheinungen;
3. den Verlauf der Atmung im *Aspergillus*-Mycel vor und nach der Kälteperiode.

I. Teil.

Die Desorganisationsvorgänge im Mycel von *Aspergillus niger* nach dem Gefrieren.

A. Methodik für die Beobachtung der Desorganisation.

Wenn die Wirkungen niedriger Temperaturen auf Pilzhyphen studiert werden sollten und besonders das Verhalten der Zellen bei nachfolgender Erwärmung, so mußte vor allem dafür gesorgt sein, daß in den Kulturen keine ungekeimten Sporen vorhanden waren. Diese sind ja sehr kälteresistent, sie würden also nach dem Gefrieren in günstigen Temperaturbedingungen keimen und das gefroren gewesene Mycel mit ihren neuen Hyphen durchwachsen. Aus dem gleichen Grunde mußte deshalb auch die Sporenbildung des Mycels verhindert werden. Dies läßt sich am besten erreichen, wenn das Mycel submers kultiviert wird oder in Luft von hohem Feuchtigkeitsgehalte. In beiden Fällen wird die Transpiration in den Hyphen aufgehoben oder wenigstens stark reduziert. Daß

diese Bedingungen zu rein vegetativem Wachstum führen, hat Klebs (1900) bei verschiedenen Pilzen nachgewiesen. Die Methode der Submerskultur, die schon aus dem angeführten Grunde als die gegebene erschien, war noch mit dem weiteren Vorteil verknüpft, daß das entstehende strahlige Mycel eine sorgfältige mikroskopische Durchmusterung bedeutend erleichterte.

Um der zuerst genannten Bedingung — der völligen Abwesenheit von ungekeimten Sporen in den Kulturen beim Beginn der Versuche — gerecht zu werden, hätte ich zu einer Isolierungsmethode für Sporen greifen können, wie sie z. B. durch Burri (Tuscheverfahren, Jena 1909) bekannt ist. Nun brauchte ich aber für jede Versuchsreihe eine große Anzahl Kulturen (30—35) von möglichst gleichem Alter, deren Herstellung nach der genannten Methode übermäßig viel Zeit und Geduld gekostet hätte. Da es zudem ja nicht darauf ankam, daß nur eine Spore der Ausgangspunkt des Mycels wurde, als vielmehr darauf, daß alle in die Kulturflüssigkeit gebrachten Sporen auch wirklich auskeimten, entschloß ich mich zu einer einfacheren Methode, bei der ich nur zu kontrollieren brauchte, daß die wenigen Sporen, die ich in die Kulturröhrchen impfte, Keimschläuche gebildet hatten. Damit war die Anwesenheit ungekeimter, aber keimfähiger Sporen nach dem Gefrieren ausgeschlossen.

In Probierröhrchen, die 3proz. Gelatinenährlösung enthielten, impfte ich Sporen von *Aspergillus niger*, verteilte sie durch Schütteln gleichmäßig und ließ sie bei + 22—25° C während 12 bis 15 Stunden keimen. Die Gelatine blieb bei dieser Temperatur dickflüssig und verhütete, daß die Sporen aneinander hafteten, wie es in wässeriger Nährlösung der Fall war. Mit einer sterilen Kapillare verteilte ich nun von dieser Sporenaufschüttelung kleine Tropfen auf sterile Deckglasstückchen und untersuchte mikroskopisch (ohne Deckglas), ob alle Sporen Keimschläuche gebildet hatten. Waren die (6—10) Sporen sämtlich ausgekeimt, so wurde der Deckglassplitter in ein Röhrchen mit 3 ccm Nährlösung[1]) ge-

1) Nährlösung (vgl. Bartetzko, 1910, S. 61):

4 g NH_4NO_3	
2 g KH_2PO_4	
0,2 g $MgSO_4$	1000 ccm destill. Wasser.
0,1 g $CaCl_2$	
1 Tropfen 5proz. $FeCl_3$-Lösung	
50 g Rohrzucker	

bracht. Während der kurzen Dauer der mikroskopischen Durchmusterung erhöhte sich durch Verdunstung die Konsistenz des kleinen Gelatinetropfens, wodurch ein Haften der Sporen an dem Deckglasstückchen erreicht und damit eine submerse Entwicklung gesichert wurde. Unter den nötigen Vorsichtsmaßregeln war eine Bakterieninfektion ausgeschaltet. Nach Verlauf einer bestimmten Zeit, während der sich bei + 32° C ein Mycel entwickelt hatte, wurden die Kulturen der Kälte ausgesetzt. Als Gefrierraum diente die gleiche Anordnung, wie sie bei Bartetzko (1910, S. 61) und A. Winkler (1913, S. 469) beschrieben ist: In einen durch Heu nach außen isolierten Kupferkessel wurden zylindrische Messinggefäße gesetzt, die dann mit Kältemischung umgeben wurden (Eis + NaCl). Die Röhrchen mit den Kulturen waren in den Messinggefäßen an einer durchlöcherten Korkplatte befestigt. Durch die Öffnung des Gefäßdeckels ragte ein Thermometer, dessen Skala sich außerhalb des Deckels befand (Skaleneinteilung + 5° bis — 30° C), fast bis auf den Boden des Gefäßes. Hatte die Temperatur — 10° C erreicht — dies geschah innerhalb 1 bis 1½ Stunde — dann wurden die Röhrchen mit Eiskristallen von steriler Nährlösung geimpft, um Unterkühlung zu vermeiden und um den gleichzeitigen Eintritt der Eisbildung in allen Kulturen zu erreichen. Die Temperatur im Gefrierraume schwankte innerhalb 24 Stunden im allgemeinen nur um 1—1,5°. In den Tabellen ist die Endtemperatur in Klammern angegeben, wenn die Temperatursteigerung größer als 1,5° war.

Nach der Gefrierperiode wurden die Kulturen durch Eintauchen der Röhrchen in lauwarmes Wasser schnell aufgetaut (innerhalb 5—10 Minuten). Bei den Färbeversuchen zur Entscheidung über den Zustand des Mycels wurde Anilinblau (1 : 1000) in Nährlösung verwendet. Bei vorsichtigem Ausgießen der aufgetauten Nährlösung mit dem Mycel und bei nötiger Vorsicht beim Übertragen in die Farblösung ließ sich eine Verletzung des Objektes vermeiden. — Zur mikroskopischen Untersuchung benutzte ich eine Wasserimmersion.

B. Beobachtung der Desorganisation im *Aspergillus*-Mycel nach Einwirkung von Kälte.

I. Verlauf der Desorganisation in submersen Mycelien bei Eisbildung.

Für die erste Versuchsreihe wurden 24 Stunden alte Mycelien von *Aspergillus niger* verwendet, die sich in der Nährlösung (S. 6, Anm.) submers entwickelt hatten und zwar bei + 32°. Diese Objekte wurden verschieden lange der Kälte ausgesetzt.

Tabelle I enthält die Beobachtungen an 24 Stunden alten Kulturen, die bei — 10 bis — 12° C gefroren waren.

Nach 3stündiger Gefrierdauer ist sofort nach dem Auftauen in den Hyphen noch keine sichtbare Desorganisation eingetreten. Nur die Spitzenzellen sind färbbar und lassen sich nicht plasmolysieren. In den älteren Zellen ist dagegen noch Plasmolyse möglich.

Eine Gefrierzeit von 6 Stunden hat schon größere Veränderungen im Protoplasma zur Folge. In vielen Zellen ist der Inhalt stark körnig, die Vakuolen sind geschwunden. Nur in ungefähr 2 % aller Zellen besitzt der Protoplast noch die normale Struktur.

Die dritte Serie von Kulturen war der tiefen Temperatur 12 Stunden ausgesetzt. Nach dem Auftauen zeigt sich, daß der Protoplast sich in den Spitzenzellen von der Wand losgelöst hat, in angrenzenden Zellen ist der Inhalt zusammengeballt. Bis auf wenige Zellen sind alle mit Anilinblau färbbar. Die ungefärbten, ca. 2 %, haben noch Vakuolen im Plasma und lassen sich mit 10—12 % KNO_3-Lösung plasmolysieren.

Auch in den Mycelien von *Aspergillus niger*, die 24 Stunden in der Kälte gehalten wurden, spielen sich die gleichen Desorganisationsvorgänge ab. Es ist verständlich, daß die Zahl der Zellen mit anscheinend unveränderter Struktur sich vermindert hatte und auch diese wenigen müssen schon eine tiefgreifende Schädigung erfahren haben, da sie sich nicht mehr plasmolysieren lassen.

Es treten also nach diesen Beobachtungen schon während der Kältewirkung Veränderungen in der Struktur des protoplasmatischen Inhaltes auf, aber nicht in allen Zellen. Die Desorganisation verläuft in den einzelnen Zellen nicht mit gleicher Schnelligkeit. Wir beobachten gleich nach dem Auftauen sowohl Zellen mit kollabiertem Plasma, als auch solche, in denen die Desorganisation be-

Tabelle I *(Aspergillus niger).*

Alter der Kultur	Gefriertemperatur °C	Dauer des Gefrierens	Weiter kultiviert: Temperatur °C	Weiter kultiviert: Zeitdauer	Ergebnis der Beobachtungen
24 Std.	—	—	—	—	Kontrollkultur: Plasma homogen, ältere Zellen mit großen Vakuolen.
24 Std.	— 12°	3 Std.	—	sofort untersucht	Zellen mit etwas körnigem Plasma, noch nicht auffallend desorganisiert. Endzellen der Hyphen sind färbbar[1]). Nur in den Basalzellen ist Plasmolyse möglich bei 12—15 % KNO_3; Basalzellen nicht färbbar.
„	„	„	+ 20°	20 Std.	5 % der Zellen mit homogenem Plasma und Vakuolen, nicht färbbar! Diese haben neue Hyphen gebildet. Alle anderen Zellen gefärbt[1]). Inhalt desorganisiert, teils körnig, teils kollabiert.
„	„	„	+ 32°	„	Desorganisation ausgeprägter, als bei vorhergehendem Versuche. Nur wenige nicht färbbare Zellen mit neugebildeten Hyphen.
24 Std.	— 11°	6 Std.	—	sofort untersucht	Zellen mit stark deformiertem Inhalt! Nur ca. 2 % aller Zellen enthalten kleine Vakuolen, sind nicht färbbar[1]) und lassen sich plasmolysieren.
„	„	„	+ 20°	20 Std.	Nur wenige ungefärbte Zellen, alle anderen mit kollabiertem Inhalte! Einzelne nicht färbbare Zellen haben neue Hyphen gebildet.
„	„	„	+ 32°	„	Alle Zellen desorganisiert!
24 Std.	— 11°	12 Std.	—	sofort untersucht	Plama der Zellen durchweg körnig, besonders in den Spitzenzellen zusammengeballt. Einige Zellen, oft 3—4 aneinander, besitzen noch Vakuolen im Plasma, Plasmolyse bei 10—12 % KNO_3.
„	„	„	+ 20°	14 Std.	Alle Zellen desorganisiert, mit Anilinblau färbbar! Keine neuen Hyphen gebildet!
„	„	„	+ 32°	„	Desorganisation in allen Zellen eingetreten. Plasma färbbar[1]). — Ausnahmefall (größere Kultur): Mycel mit geringem Zuwachs neuer Hyphen.
24 Std.	— 10,5°	24 Std.	—	sofort untersucht	Mycel färbbar, teils mit kollabiertem Plasma, teils noch mit gleichmäßig verteiltem Inhalte und Vakuolen, aber auch färbbar (beginnende Desorganisation!) Keine Plasmolyse möglich!!
„	„	„	+ 20°	24 Std.	Vereinzelte Zellen noch mit Vakuolen, ohne Sprossung neuer Hyphen, alle anderen sichtlich desorganisiert.
„	„	„	+ 32°	„	Desorganisation in allen Zellen eingetreten!

1) „Färbbar“ und „nicht färbbar“ bezieht sich stets auf Anilinblau.

ginnt, ferner solche, denen eine Schädigung zwar mikroskopisch nicht anzusehen ist, die aber nicht mehr plasmolysierbar sind, und endlich einzelne, die sich noch plasmolysieren lassen und deren Struktur ganz normales Aussehen besitzt. Das besagt allerdings nicht, daß sie die Kälteperiode völlig unversehrt überstanden haben; jedenfalls sind aber die erfahrenen Schädigungen weitaus geringer, als in den übrigen Zellen. Während diese abgestorben sind, zeigen jene noch wesentlich Anzeigen vorhandenen Lebens.

Welche Wirkung hat nun günstige Temperatur auf den weiteren Verlauf der Desorganisation in den einzelnen Zellen?

Nach gleicher Methode behandelte Kulturen wurden nach dem Auftauen einige Zeit bei + 20° C und z. T. bei + 32° C belassen und dann in derselben Weise auf die Desorganisation untersucht.

Wie aus Tabelle I (S. 9) hervorgeht, ist die Desorganisation nach dem Verweilen in hoher Temperatur fortgeschritten. Das Plasma ist in allen denjenigen Zellen, die bei früheren Versuchen sofort nach der Kälteperiode abgestorben waren, auch jetzt kollabiert und mit Anilinblau färbbar. Je nach der vorhergegangenen Gefrierdauer ist die Deformation auch in den übrigen Zellen mehr oder weniger beträchtlich. Außerdem tritt die Desorganisation in den Zellen der bei + 32° C weiter kultivierten Mycelien etwas schneller ein als in den bei + 20° C gehaltenen Kulturen. Dies ist ein beachtenswerter Punkt, da beim Zutreffen der Richterschen Angaben gerade das Umgekehrte der Fall sein müßte.

Von den Zellen, die unmittelbar nach dem Auftauen noch Lebensäußerungen zeigten, ist ein Teil ebenfalls abgestorben, der andere hingegen am Leben geblieben und zu neuen Hyphen ausgewachsen. Diese resistenten Zellen des Mycels sollen künftig kurz als „Dauerzellen“ bezeichnet werden. Leichtere Schädigungen, die sie eventl. während der Kälteperiode erlitten, gleichen sie aus. Über ihr Verhalten wird im Abschnitt C ausführlicher berichtet werden, hier sei nur die ganz verständliche Beobachtung erwähnt, daß der Zuwachs von Neumycel bei einer Temperatur von + 32° C reichlicher ist als bei + 20° C. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die Desorganisation in den Spitzenzellen weit allgemeiner ist als bei älteren Mycelteilen, auf die die Dauerzellen allein beschränkt sind.

Versuche mit älteren (48 Stunden alten) Mycelien von *Aspergillus niger* ergaben, daß mit zunehmendem Alter die Zahl der resistenten Zellen größer wird. Die Versuchsanordnung, Gefrier-

Tabelle II *(Aspergillus niger).*

Alter der Kultur	Gefriertemperatur °C	Dauer des Gefrierens	Weiter kultiviert: Temperatur °C	Weiter kultiviert: Zeitdauer	Ergebnis der Beobachtungen
48 Std.	—	—	—	—	Kontrollkultur: Plasma der Zellen homogen, ältere Zellen mit großen Vakuolen, Plasmolyse bei 12—15 % KNO_3.
48 Std.	— 12°	4½ Std.	—	sofort untersucht	Schädigung gering, 75 % aller Zellen besitzen noch Vakuolen und sind plasmolysierbar und nicht färbbar[1]).
„	„	„	+ 20°	20 Std.	Resistente Zellen vorhanden, ca. 10 %, einzelne haben während dieser 20 Stunden neue Hyphen gebildet.
„	„	„	+ 32°	„	Resistente Zellen mit neugebildeten Hyphen, Plasmolyse bei 15 % KNO_3. Desorganisation in den übrigen Zellen fortgeschritten.
48 Std.	— 12°	7 Std.	—	sofort untersucht	Zellen, oft 2—8 zusammenhängend, ca. 10 %, mit nicht färbbarem[1]), teils körnigem Plasma, Plasmolyse bei 15 % KNO_3. Die übrigen Zellen besitzen desorganisierten Inhalt, sind färbbar, in einzelnen oft noch kleine Vakuolen.
„	„	„	+ 20°	40 Std.	Desorganisation in den erfrorenen Zellen die gleiche, geringer Zuwachs aus einzelnen resistenten Zellen, vgl. Fig. 2, S. 23.
„	„	„	+ 32°	„	Desorganisation in den geschädigten Zellen nicht ausgeglichen, Zahl der neugebildeten Hyphenzellen mit großen Vakuolen beträchtlich!
48 Std.	— 11°	17 Std.	—	sofort untersucht	Desorganisation der Spitzenzellen deutlich, Zellen gefärbt[1]), nur ca. 5 % aller Zellen haben noch Vakuolen im Plasma, dieses körnig. Plasmolyse bei 12—15 % KNO_3.
„	„	„	+ 20°	26 Std.	Geringer Zuwachs neuer Hyphen, die Desorganisation in allen übrigen ist die gleiche.
„	„	„	+ 32°	30 Std.	Zuwachs größer als im vorhergehenden Versuche, im übrigen ist der Zustand des Mycels derselbe.
48 Std.	— 11°	24 Std.	—	sofort untersucht	Bis auf wenige Zellen sind alle färbbar, teils desorganisiert, teils noch mit Vakuolen versehen (diese im Schwinden begriffen!). Die wenigen lebend aussehenden Zellen sind plasmolysierbar.
„	„	„	+ 20°	30 Std.	Desorganisation fortgeschritten, selten lebende Zellen mit neuen Hyphen!
„	„	„	+ 32°	„	Desorganisation in allen Zellen eingetreten, bis auf zählbare Mengen überlebender, diese mit neuen seitlichen Hyphen.

1) „Färbbar“ und „nicht färbbar“ bezieht sich stets auf Anilinblau.

zeiten und Temperaturen sind annähernd die gleichen wie bei den vorhergehenden Versuchen. Die in Tabelle II mitgeteilten Ergebnisse können also mit den früheren verglichen werden.

Sofort nach dem Auftauen der Kulturen ist der Zustand der Zellen der gleiche, wie bei den jüngeren Mycelien: viele Zellen haben das Aussehen lebender und lassen sich auch plasmolysieren. Die Desorganisation schreitet auch bei + 20° und + 32° C in der beobachteten Weise fort. Es ist aber bemerkenswert, daß die Zahl der überlebenden Zellen relativ größer ist, als in den 24 Stunden alten Kulturen, und daß auch nach langer Gefrierdauer noch Zellen beobachtet werden können, die noch lebensfähig erscheinen. Während z. B. nach Tabelle I (S. 9) in einem 24 Stunden alten Mycel von *Aspergillus niger* nach 3stündiger Gefrierdauer die Desorganisation schließlich in 95 % aller Zellen eintritt, sind in einer 48 Stunden alten Kultur unter ähnlichen Bedingungen noch ca. 10 % turgeszente Zellen vorhanden. Selbst eine 24stündige Einwirkung niedriger Temperatur halten einige Zellen im Mycel aus, während in den jüngeren (24 Stunden alten) Kulturen schon nach 6 Stunden Gefrierdauer selten lebende Zellen zu finden sind.

Wenn wir berücksichtigen, daß in vielen Zellen die sichtbare Desorganisation erst nach dem Erwärmen eintritt, so liegt die Vermutung nahe, diesen Fortgang der Desorganisation als Effekt des plötzlichen Temperaturwechsels von — 12° C auf + 20° oder + 32° C anzusehen. Demnach wäre denkbar, daß nach dem Gefrieren ein vorübergehender Aufenthalt der Kulturen im Eisschranke (+ 4° C), also ein allmählicher Übergang zu hoher Temperatur vorteilhaft ist, so daß möglicherweise der Fortgang der Desorganisation verzögert, wenn nicht gar in einzelnen Zellen verhütet wird.

Tabelle III enthält das Ergebnis der Versuche, die auf Grund dieser Erwägung angestellt wurden. Die Desorganisation schreitet in den Zellen in gleicher Weise fort, ja die Zahl der scheinbar nicht geschädigten Zellen verringert sich sogar. Viele der Zellen, die, entsprechend früheren Erfahrungen, nach einem Aufenthalte bei + 32° C noch Vakuolen und gleichmäßig verteiltes Plasma besaßen, sind unter den jetzigen Versuchsbedingungen abgestorben. Daraus folgt also, daß in einigen Zellen, die unmittelbar nach dem Gefrieren noch deutliche Kriterien des Lebens zeigen, die Desorganisation verhindert werden kann, wenn die Mycelien sofort nach der Kältewirkung in günstige Temperaturbedingungen gebracht werden. Bereits auf S. 10 wurde darauf hingewiesen, daß auch die

Tabelle III *(Aspergillus niger).*

Alter der Kultur	Gefriertemperatur °C	Dauer des Gefrierens	Weiter kultiviert: Temperatur °C	Weiter kultiviert: Zeitdauer	Ergebnis der Beobachtungen
48 Std.	— 10°	2½ Std.	—	sofort untersucht	Schädigung gering. Zwischen Zellen, die färbbar[1]) sind, liegen viele ungefärbte[1]) mit großen Vakuolen. Die Spitzenzellen haben noch intaktes Aussehen, sind aber färbbar.
„	„	„	+ 4°	20 Std.	Desorganisation noch nicht deutlich! Plasma teilweise stark körnig, viele resistente Zellen vorhanden!
„	„	„	+ 4°	68 Std.	Viele Zellen mit Vakuolen vorhanden, nicht färbbar[1]), Desorganisation in manchen Zellen auffallend.
„	„	„	+ 4°	44 Std.	Zwischen den desorganisierten Zellen liegen lebensfähige, die ein neues Mycel geliefert haben.
			hierauf		
			+ 32°	24 Std.	
48 Std.	— 10°	6 Std.	—	sofort untersucht	Beginn der Desorganisation. Viele Zellen färbbar; einzelne ungefärbte Zellen mit Vakuolen im Plasma.
„	„	„	+ 4°	17 Std.	Besonders die Spitzenzellen sind desorganisiert und färbbar[1]). Einige mittlere Zellen der Hyphen haben noch Vakuolen. — In unterkühlter Kultur: Beginn der Desorganisation.
„	„	„	+ 4°	40 Std.	Alle Zellen desorganisiert, ganz selten ist eine scheinbar lebende Zelle zu beobachten.
„	„	„	+ 4°	40 Std.	Kulturen abgestorben, nur in einem Mycel lassen sich neue Hyphen beobachten.
			hierauf		
			+ 32°	24 Std.	
48 Std.	— 10°	22 Std.	—	sofort untersucht	Deformation in vielen Zellen ausgeprägt, diese Zellen färbbar[1]).
„	„	„	+ 4°	24 Std.	Plasma in den meisten Zellen kollabiert, einige wenige Zellen mit etwas körnigem Plasma sind anscheinend lebend.
„	„	„	+ 4°	48 Std.	Alle Zellen tot, Mycel färbbar. Hierauf in + 32° C: kein Zuwachs.
„	„	„	+ 4°	24 Std.	Geringer Zuwachs, Ursprung der neuen Hyphen nicht sichtbar, jedenfalls nur von wenigen Zellen ausgehend.
			hierauf		
			+ 32°	24 Std.	
48 Std.	— 11° (— 9°)	48 Std.	—	sofort untersucht	Die Desorganisation (Kollaps des Protoplasten) ist in allen Zellen eingetreten, Hyphen färbbar[1]).
„	„	„	+ 4°	24 Std.	Dasselbe.
„	„	„	+ 4°	24 Std.	Dasselbe.
			hierauf		
			+ 32°	24 Std.	

1) „Färbbar“ und „nicht färbbar“ bezieht sich stets auf Anilinblau.

scheinbar unveränderten und plasmolysierbaren Zellen möglicherweise eine Schädigung erfahren haben, da ja geringere Schädigungen sich dem direkten Nachweise mit unseren Hilfsmitteln entziehen. Hier zeigt sich nun, daß solche Schädigungen in der Tat vorliegen müssen: unter nachfolgenden günstigen Bedingungen werden sie überwunden, unter weniger günstigen haben sie den Tod zur Folge. Man kann diese Zellen also als „geschwächt" bezeichnen, da sie nur unter günstigen Temperaturbedingungen leben bleiben. In diesem Sinne kann ich mich Richters Angaben anschließen, wonach *Aspergillus*-Zellen unter Umständen aus dem Schwächezustande durch günstige Temperatur gerettet werden können. Der Unterschied aber zwischen der Auffassung dieses Forschers und meinen Beobachtungen besteht darin, daß nach Richter der Schwächezustand in allen Zellen vorhanden ist und gehoben werden kann, während aus meinen Ergebnissen feststeht, daß nur einzelne Zellen durch hohe Temperatur günstig beeinflußt werden können und zwar nur solche, die man unmittelbar nach dem Auftauen als lebend bezeichnen muß. Dagegen lassen sich stärkere Konfigurationsänderungen, wie sie in der Mehrzahl der Zellen eingetreten sind, besonders der Kollaps unter keinen Umständen ausgleichen. Deshalb ist auch für diese Kategorien von Zellen die Bezeichnung „geschwächt" nicht am Platze. In der sichtbaren Veränderung ihrer Struktur, bedingt durch das Schwinden des Turgors, ist vielmehr mit Klemm (1895, S. 624) ein untrügliches Zeichen des eingetretenen Todes zu sehen.

II. Verlauf der Desorganisation in submersen Mycelien von *Aspergillus niger* bei Vermeidung der Eisbildung.

Bartetzko (1910, S. 64—67) kam bei seinen Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß Schimmelpilze nach längerer Kältewirkung auch in unterkühlter Kulturflüssigkeit absterben.

Für die vorliegenden Untersuchungen war nun folgende Frage von Bedeutung: Lassen sich in den *Aspergillus*-Mycelien auch nach Unterkühlung die gleichen Desorganisationserscheinungen beobachten, wie nach Einwirkung von Kälte bei Eisbildung, und sind hier diese Desorganisationsvorgänge reparabel?

Um einen Vergleich mit den im vorigen Abschnitte geschilderten Ergebnissen zu ermöglichen, mußte ich annähernd die gleiche Temperatur für die Kälteperiode der Kulturen wählen. Die oben ge-

stellte Frage konnte aber deswegen nicht eingehend behandelt werden, weil es trotz aller Vorsicht (Vermeidung jeder Erschütterung usw.) nicht immer gelang, die Kulturen unterkühlt zu erhalten. Meist trat während der Temperaturerniedrigung auf — 12° bis — 14° C Eisbildung in der Nährlösung ein. So blieben z. B. bei einer Versuchsreihe von 36 Kulturen nur 5 unterkühlt. Ich muß mich deshalb darauf beschränken, einzelne typische Beobachtungen zu schildern.

48 Stunden alte *Aspergillus*-Kulturen waren während 8 Stunden bei — 13° C unterkühlt geblieben. Unmittelbar nach der Einwirkung der Kälte war das Mycel mit Anilinblau noch nicht färbbar, in manchen Zellen aber hatte das Plasma eine körnige Struktur angenommen. Die meisten Zellen besaßen noch Vakuolen und ließen sich plasmolysieren. Nur in einigen Spitzenzellen war keine Plasmolyse möglich.

Einige Kulturen wurden nach dieser Untersuchung während 15 Stunden bei + 32° C gehalten. Viele Zellen besaßen dann kollabiertes Plasma, oft waren aber nur die Vakuolen geschwunden. Einzelne lebende Zellen hatten an mehreren Stellen kräftige Hyphen ausgetrieben.

Eine andere Kultur war 24 Stunden lang bei — 11° C unterkühlt erhalten und wurde dann 48 Stunden bei + 32° C weiter kultiviert: Der Kollaps des Protoplasten trat in vielen Zellen, besonders in den Spitzenzellen ein, einige ältere Zellen waren noch lebensfähig und hatten seitlich Hyphen gebildet.

Schon diese Beobachtungen zeigen, daß in den *Aspergillus*-Zellen nach Einwirkung niedriger Temperatur bei Vermeidung der Eisbildung die gleichen Desorganisationserscheinungen Platz greifen, wie sie aus den vorhergehenden Versuchen bekannt sind. Wir beobachten sowohl eine Granulation des Protoplasmas, als auch das Zurückweichen des Protoplasmas von der Zellwand. Die Desorganisationserscheinungen treten allerdings meist erst nach dem Wiedererwärmen der Kultur ein, während sie unter der Wirkung gefrorener Nährlösung teilweise direkt nach dem Auftauen sichtbar werden. Auch nach Unterkühlung sind die eingetretenen Konfigurationsänderungen des Protoplasten nicht durch günstige Temperatur ausgleichbar.

Im Anschluß an die Beobachtungen über den Kältetod bei Unterkühlung möchte ich eine Behauptung Maximows nicht unwidersprochen lassen. Er sagt (1912, S. 504): „Man kann jetzt

für sichergestellt halten, daß die Eisbildung für den Kältetod unbedingt notwendig ist und daß die Zelle ohne Schaden die stärkste Unterkühlung ertragen kann.“ Diese Behauptung gilt höchstens unter der Voraussetzung einer kurzen Kälteperiode für bestimmte Objekte. Nur in diesem Sinne dürften auch Voigtländers Resultate zu verstehen sein. Nach seiner Tabelle VIII (1909, S. 377) sind seine Versuchsobjekte selbst nach einer Unterkühlung von 5—7° C unter den Erfrierpunkt (Eistodespunkt) lebend. Die Angaben über die Dauer der Abkühlung fehlen, aber aus der Bemerkung, daß die Objekte nur bis zur Maximalabkühlung niedriger Temperatur ausgesetzt waren, um dann wieder erwärmt zu werden, ist zu schließen, daß die Versuche ungefähr 2 Stunden währten. Der Lebenszustand der Zellen wurde von Voigtländer (S. 376) zwar gleich nach dem Auftauen kontrolliert, aber das weitere Verhalten der Zellen nicht mehr verfolgt. Nun wissen wir aus meinen Beobachtungen an *Aspergillus niger*, daß Zellen, die unmittelbar nach dem Auftauen noch deutliche Lebensreaktion geben, trotzdem so weit geschädigt sein können, daß über kurz oder lang ihr Tod erfolgt. Zu vermuten ist, daß es sich bei Voigtländer um ähnliche Erscheinungen handelte.

Einige Forscher unterscheiden in dem schnellen und langsamen Absterben nach der Abkühlung zwei Todesarten. Apelt (1909, S. 219) z. B. bezeichnet in Anlehnung an Mez diese beiden Todesursachen als „Tod durch Kälte“ und „Tod infolge Kälte“. „In letzterem Falle wäre die erreichte tiefe Temperatur nicht als eine direkte Todesursache, sondern als Ursache einer zum Tode führenden Krankheit anzusehen.“ — Voigtländer nennt nur das sofortige Absterben „typischen Kältetod“ und meint, daß dieser Tod nur bei Eisbildung möglich sei.

Die übermäßige Betonung dieses Unterschiedes hat dazu geführt, daß von einzelnen Forschern bei der theoretischen Betrachtung des Erfriertodes nur das sofortige Absterben durch Kälte diskutiert wird. Da nun Pflanzen durch subminimale Abkühlung ohne Eisbildung häufig erst nach der Kältewirkung absterben, so gehört der Tod durch Unterkühlung nach dem Sprachgebrauche dieser Forscher in das Kapitel der Krankheitserscheinungen, des „Erkältungstodes“, und wird deshalb bei theoretischen Erörterungen nicht berücksichtigt. Nur durch solches Vorgehen war es möglich, eine „Wasserentziehungs-Theorie“ des Erfrierens als einzige Lösung des Problems hinzustellen (Müller-Thurgau, 1886) und sie einseitig

zu vertreten (Maximow, 1914). Aber für die Theorie des Erfrierens ist doch auch die Tatsache wichtig, daß z. B. Pflanzen südlicher Klimate bei Temperaturen über dem Eispunkte absterben (Molisch, 1896, S. 82—85), und schließlich beweist die Empfindlichkeit der thermophilen Bakterien und Pilze gegenüber Temperaturen weit oberhalb des Nullpunktes, daß ein schnelles Absterben, also ein typischer Kältetod im Sinne Voigtländers, auch ohne Eisbildung möglich ist (Noack, 1912).

Wenn einzelne Autoren auf die „direkte" Todesursache durch Eisbildung soviel Wert legen, so scheint mir darin eine Verkennung der wesentlichen und unwesentlichen Faktoren zu liegen. Zweifellos ist in der Eisbildung beim Kältetode der Pflanzen ein beschleunigendes oder auch in bestimmten Fällen das entscheidende Moment zu sehen. Jedoch kann die Tötung — wie beim Unterkühlungstode — bewirkt werden durch die infolge der niederen Temperatur hervorgerufenen Störungen im Ablauf der vitalen Prozesse. An dieser Auffassung wird auch nichts durch die Möglichkeit geändert, daß unter Umständen bei bestimmten Objekten eine Kältewirkung allein noch nicht zur vollständigen Sistierung der Lebensprozesse führt und daß erst die Eisbildung die Schädigung über die Grenze der Reversibilität hinaus steigert.

Aus den Erörterungen in den vorhergehenden Absätzen ergibt sich nun eine Regel für die praktische Durchführung von Versuchen über die Kälteresistenz. Um nicht zu falscher Vorstellung von der Widerstandsfähigkeit einer Pflanze gegen Kälte zu gelangen, ist es notwendig, auch in einem gewissen Zeitraume nach der Kälteperiode nochmals zu untersuchen, ob die Zellen leben oder nicht.

III. Beobachtung der Desorganisation in Lufthyphen von *Aspergillus niger*.

Bei den bisher ausgeführten Versuchen handelte es sich stets um ein untergetaucht kultiviertes *Aspergillus*-Mycel. Da nun die Lufthyphen in teilweise anderen Bedingungen leben als die untergetaucht wachsenden Zellen, so war festzustellen, ob die Lufthyphen eventl. einen anderen Resistenzgrad besitzen. Auch der Verlauf der Desorganisation mußte verfolgt werden.

Das Mycel von *Aspergillus niger* wurde auf erstarrter Gelatine kultiviert, welche die genannten Nährstoffe in gleichen Mengen

(vgl. S. 6 Anm.) enthielt, wie die Nährlösung. Die Gelatine-Nährböden befanden sich auf Objektträgern in sterilen Petrischalen. Auf jedem Objektträger wurde ein großer Tropfen 7proz. Nährgelatine breitgegossen und auf diese Gelatineschicht ein kleiner Tropfen 3proz. Nährgelatine mit ausgekeimten Sporen gebracht. Die Mycelien entwickelten sich nun in den Petrischalen unter feuchter Glocke bei + 32° C und bildeten während ca. 20 Stunden feine Lufthyphen und ein Strahlenmycel in der Gelatine. Schon nach diesen 20 Stunden zeigten sich an einigen Mycelien Anfänge der Konidienbildung, die Kulturen mußten also spätestens in diesem Stadium der Kältewirkung ausgesetzt werden. Die Petrischalen mit den Kulturen kamen in den Gefriergefäßen in eine Temperatur von ca. — 13° C.

Nach dem Gefrieren und Wiedererwärmen beobachtete ich die Kulturen mikroskopisch ohne Deckglas (Objektiv V Seibert), da die für eine genaue Beobachtung notwendige gleichmäßige Benetzung dieses sammetartigen Mycels nicht gut möglich war. Wenn auch diese Methode Nachteile hat, so ließen sich doch Zusammenballungen des Inhaltes der Lufthyphen, wie sie auch zur Kontrolle bei Kulturen unter Deckglas beobachtet wurden, deutlich wahrnehmen. Zugleich war es möglich, die Lufthyphen von den Submerszellen in der Gelatine bequem zu unterscheiden und den Übergang von letzteren zu Lufthyphen zu verfolgen. Auf plasmolytische Untersuchung und Versuche über die Färbbarkeit der Hyphen mit Anilinblau mußte ich hier verzichten.

Tabelle IV gibt eine Zusammenstellung der Beobachtungen. Es wurden verschiedene Gefrierzeiten angewendet und die Kulturen teils bei + 25° C, teils bei + 32° C weiter kultiviert. In den Kontrollkulturen war das Plasma in allen Hyphen homogen, in den älteren Basalzellen vakuolig.

Die Desorganisationserscheinungen nehmen nach dem Gefrieren in den untergetaucht wachsenden Zellen den früher geschilderten Verlauf, und auch in den Lufthyphen treten die gleichen Veränderungen des Protoplasten auf. Die Lufthyphen sind aber widerstandsfähiger gegen Kälte, denn erst längere Gefrierzeiten bewirken die gleichen Veränderungen im Protoplasten, die wir in den von Gelatine umgebenen Hyphen beobachten. Z. B. hat eine Gefrierdauer von $4^1/_2$ Stunden keinen sichtbaren Einfluß auf den Zustand des Protoplasmas in den Lufthyphen, auch nach $7^1/_2$stündiger Kältewirkung tritt die Desorganisation erst nach dem Verweilen in günstiger

Tabelle IV (*Aspergillus niger*, Lufthyphen).

Alter der Kultur	Gefriertemperatur °C	Dauer des Gefrierens	Weiter kultiviert: Temperatur °C	Weiter kultiviert: Zeitdauer	Ergebnis der Beobachtungen
20 Std.	— 11°	4½ Std.	—	sofort untersucht	Plasma in Lufthyphen homogen, wie in der Kontrollkultur. In den Submerszellen ist teilweise die Desorganisation eingetreten.
„	„	„	+ 25°	18 Std.	Lufthyphen ohne sichtbare Schädigung. In den Submerszellen ist die Desorganisation fortgeschritten, einzelne Zellen sind lebend und bilden neue Hyphen. Sporenbildung setzt ein.
„	„	„	+ 32°	18 Std.	Dasselbe.
20 Std.	— 13°	7½ Std.	—	sofort untersucht	In den Submerszellen ist die Desorganisation bis auf wenige lebensfähige in allen eingetreten. Die Lufthyphen sind scheinbar noch nicht geschädigt.
„	„	„	+ 25°	15 Std.	Die Dauerzellen des Submersmycels gehen zur Bildung von Lufthyphen über, die Konidien abschnüren. In den anderen Lufthyphen tritt in den Basalzellen die Desorganisation ein.
„	„	„	+ 32°	15 Std.	Lufthyphen teilweise noch lebensfähig. Gleichfalls Bildung langer Lufthyphen aus Dauerzellen. Konidien noch weiß!
20 Std.	— 13° (— 11°)	24 Std.	—	sofort untersucht	Submerszellen desorganisiert, auch in unterkühlten Kulturen, Lufthyphen mit basalen desorganisierten Zellen.
„	„	„	+ 25°	20 Std.	Lufthyphen und Submerszellen mit kollabiertem Plasma, auch die Spitzenzellen der Lufthyphen sind tot. Keine Sporenbildung.
„	„	„	+ 32°	„	Dasselbe.

Temperatur ein und zwar zuerst in den Basalzellen. Eine totale Desorganisation des Zellinhaltes der Lufthyphen und das Absterben der Hyphenzellen läßt sich oft erst nach einer Gefrierdauer von 24 Stunden feststellen.

Worauf die größere Resistenz der Lufthyphen gegenüber den untergetaucht wachsenden *Aspergillus*-Zellen beruht, läßt sich nicht sicher feststellen. Die früheren Beobachtungen über den verschieden schnellen Verlauf der Desorganisationsvorgänge in gefrorenen und unterkühlten Kulturen zeigen, daß eine umgebende gefrorene Flüssigkeit durch die wasserentziehende Wirkung der Eisbildung die Desorganisation und das Absterben beschleunigt. Das Moment der Wasserentziehung braucht aber bei den Lufthyphen nicht zu fehlen. Es ist bekannt, daß sich an Pflanzenteilen (Stengeln, Blättern usw.), die sich in Luft befinden, an der Oberfläche durch Ausfrieren des Imbibitionswassers, Eis bilden kann. Auch bei den *Aspergillus*-Lufthyphen können sich analoge Vorgänge abspielen. Ob nun bei der Eisbildung auf der Oberfläche der Lufthyphen der Wasserverlust der Zellen geringer ist, als bei den submersen Hyphenzellen, und ob dadurch eine geringere Schädigung der Lufthyphen bedingt ist, muß unentschieden bleiben. Zugunsten dieser Vermutung spräche allerdings die Beobachtung, daß die Basalzellen der Lufthyphen zuerst desorganisieren, da sie meist der Wirkung der gefrorenen Nährflüssigkeit, also vielleicht stärkerer Wasserentziehung ausgesetzt sind.

In den aufgetauten Kulturen tritt nach dem Verweilen bei hoher Temperatur Sporenbildung ein, und zwar gehen meist die Lufthyphen, die das Gefrieren überstanden haben, zur Sporenbildung über. Außerdem bilden auch überlebende Submerszellen Lufthyphen und Konidien. Das sofortige Übergehen der überlebenden Lufthyphen zur Sporenbildung läßt auch noch eine zweite Erklärungsmöglichkeit für ihre Resistenz offen. An jenen Stellen sind allem Anscheine nach schon vor dem Gefrieren[1]) die zur Sporenbildung benötigten Materialien angehäuft, unter denen sich sehr wohl Schutzstoffe im Sinne der Ausführungen auf S. 3 befinden könnten. Auch diese Deutung würde mit der größeren Resistenz der Spitzenzellen im schönsten Einklang stehen.

1) Man vergleiche hierzu die Tatsache, daß 20 Stunden alte Mycelien bereits die ersten morphologischen Andeutungen der Fruktifikation zeigen (vgl. S. 18).

Verfolgen wir nun noch einmal die Desorganisationsvorgänge des Protoplasten in den *Aspergillus*-Zellen. Als augenfälligste Eigenschaft des Protoplasmas nach dem Gefrieren ist die körnige Struktur zu nennen. Auch in unterkühlten Objekten nimmt das Protoplasma den gleichen Zustand an. Also dürfte die Granulation eine Folge der Temperaturerniedrigung sein.

Weitere sichtbare Desorganisationsvorgänge spielen sich meist erst in gewissen Zeiträumen nach dem Gefrieren in den aufgetauten Mycelien ab. So schwinden allmählich die Vakuolen, und gleichzeitig läßt sich eine Färbbarkeit des Zellinhaltes mit Anilinblau feststellen. Die Temperaturerniedrigung bewirkt also Schädigungen in der Zelle, als deren hauptsächlichste Folge eine Änderung, meist sogar eine Vernichtung der Semipermeabilität des Plasmas eintritt. Hierdurch ist eine Diffusion des Zellsaftes nach außen möglich und als weitere Folge dieser Vorgänge tritt der Kollaps des Protoplasten ein. Diese sind nun keine spezifischen und unmittelbaren Wirkungen der Kälte, sondern, wie Klemm schon bemerkt (1895, S. 644), „Ausdrücke der allgemeinen Schädigung", die „in erheblichem Maße nur bei Temperaturen stattfinden", „die nach längerer Zeit das Absterben veranlassen". Zu beachten ist, daß solche Veränderungen in der Zelle nicht reparabel sind.

Beispiele dafür, daß Konfigurationsänderungen des Protoplasten nach der Kältewirkung sich ausgleichen, sind durch Versuche von Kühne (1864, S. 100) bekannt: In *Tradescantia*-Haaren war das Plasma nach einer plötzlichen Abkühlung auf — 14° C in kugelige Tropfen zerfallen. Beim Wiedererwärmen nach 5 Minuten trat die normale Konfiguration wieder ein. Klemm (1895, S. 642) hat die Versuche wiederholt. Er fand, daß bei plötzlicher Abkühlung tatsächlich die von Kühne geschilderten Formumwälzungen eintreten, daß aber schon eine 15 Minuten lange Abkühlung tödlich auf die Versuchsobjekte wirkt. Diese Veränderungen sind also nur innerhalb kurzer Zeiträume reversibel. Auch konnte Klemm nachweisen, daß nur plötzlicher Temperaturwechsel die charakteristischen Veränderungen des Zellinhaltes bewirkt. Diese Veränderungen kann man also spezifische und unmittelbare Wirkungen der Temperaturerniedrigung nennen.

In den *Aspergillus*-Zellen, die sich als resistent erwiesen, wurden zwar auffallende Veränderungen im Innern des Protoplasmas nicht beobachtet; es ist aber mit Sicherheit anzunehmen, daß auch diese Zellen durch die Kälte in irgend einer Weise ungünstig be-

einflußt werden, daß aber die zugefügte Schädigung in geeigneten Temperaturen behoben werden kann (vgl. S. 14). Worin diese Schädigung besteht, muß unentschieden bleiben.

C. Das Verhalten der resistenten *Aspergillus*-Zellen.

I. Die Temperaturbedingungen für die Lebensfähigkeit der resistenten Zellen.

Wie die in den Tabellen kurz skizzierten Beobachtungen zeigen, erschienen immer einige Zellen im *Aspergillus*-Mycel resistenter, als z. B. die Endzellen der Hyphen. In jenen trat nach dem Gefrieren keine sichtbare Desorganisation ein, sie erwiesen sich durchaus als lebend. Fig. 1 zeigt eine solche Zelle (×) unmittelbar nach dem Auftauen, nachdem das Mycel 8 Stunden der Kälte ausgesetzt war. Es lassen sich deutlich große Vakuolen erkennen; die Zelle blieb bei Behandlung des Mycels mit Anilinblau-Lösung ungefärbt, der Protoplast lag der Wand vollkommen an. Bei Zusatz von 10 % KNO_3-Lösung trat Plasmolyse ein.

Fig. 1. *Aspergillus*-Mycel, 8 Stunden gefroren, „Dauerzelle" (×) sofort nach dem Auftauen.

Der Einfluß günstiger Temperatur auf die überlebenden Zellen wurde gleichzeitig mit den Desorganisationsvorgängen an denselben Kulturen studiert. Die Tabellen I u. II (S. 9 u. 11) enthalten auch die Zusammenstellung der einschlägigen Beobachtungen. Das Gesamtergebnis war, wie bei der Diskussion dieser Tabellen bereits kurz angedeutet wurde: Wird das Mycel nach dem Gefrieren bei + 20° C oder + 32° C weiter kultiviert, so bilden sich nach 5—8 Stunden an den eben beschriebenen resistenten Zellen seitliche Hyphen, die sich schnell zu einem kräftigen Mycel entwickeln.

Bei den kleinen Mycelien der 24 Stunden alten *Aspergillus*-Kulturen werden sofort nach dem Auftauen stets noch lebende Zellen beobachtet. Jedoch hat das Mycel nach 12 Stunden Gefrierdauer eine solche Schädigung erfahren, daß die Lebensfähigkeit selbst beim Weiterkultivieren in optimaler Temperatur erloschen ist. Meist besitzen nur die Kulturen, die 3 Stunden und 6 Stunden gefroren waren, noch Zellen, die in günstigen Temperaturen ein

neues Mycel liefern können. Schon aus dieser Beobachtung geht hervor, daß nicht alle Zellen, die unmittelbar nach dem Gefrieren das Aussehen lebender haben, ja teilweise sogar noch plasmolysierbar sind, in günstiger Temperatur weiter wachsen. Deutlicher tritt diese Tatsache hervor bei den Beobachtungen an 48 Stunden alten Mycelien. Hier treten nach dem Gefrieren lebende Zellen oft in Verbänden von 3—6 auf; bei späteren Beobachtungen zeigt sich aber, daß die neuen Hyphen ihren Ursprung aus einer, höchstens zwei benachbarten „Dauerzellen" nehmen, während in den angrenzenden Zellen der Inhalt kollabiert ist (Fig. 2 ××).

Wir haben früher festgestellt, daß allgemein die Resistenz des Mycels mit dem Alter wächst, also die Zahl der nach dem Gefrieren lebenden Zellen zunimmt. Aber auch die Resistenz dieser Dauerzellen selbst ist größer; denn wie Tabelle II (S. 11) lehrt, halten manche Zellen in den 48 Stunden-Kulturen die Temperatur von — 12° C 24 Stunden und länger aus. (Sogar nach 48 Stunden Gefrierdauer konnte ich in einigen wenigen Mycelien noch Zellen bemerken, die wachstumsfähig waren.)

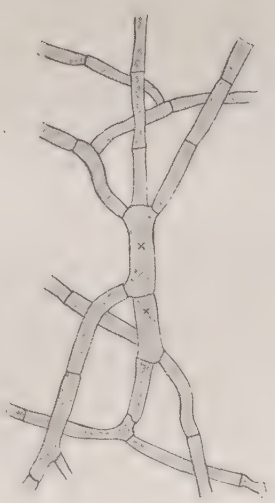

Fig. 2.
Aspergillus-Mycel, 24 Stunden gefroren, 2 „Dauerzellen" (××) nach 24 Stunden bei + 32° C.

Was nun die Temperaturbedingungen betrifft, die den resistenten Zellen geboten werden müssen, um ihre Lebensfähigkeit zu erhalten, so wurde festgestellt, daß außer optimaler Temperatur (+ 32° C) auch eine Temperatur von + 20° C fördernd auf die Lebenstätigkeit dieser Zellen wirken kann. Doch liegt diese Temperatur nahe dem Temperaturminimum, bei dem in den resistenten Zellen nach längerem Verweilen gleichfalls die Desorganisation eintritt. Richter (1910, S. 621) vermutet dieses Temperaturminimum nach den Resultaten seiner Atmungsbeobachtungen an *Aspergillus*-Mycelien bei + 18° C; ich habe die gleiche Beobachtung gemacht.

Dieses Weiterwachsen der Dauerzellen nach dem Einbringen in günstige Temperatur fand in gleicher Weise in unterkühlt gehaltenen Submersmycelien und in den Mycelien mit Lufthyphen statt. Ich deutete schon früher an, daß unter den Submerszellen

in der Gelatine einige ihre Wachstumsfähigkeit auch nach dem Gefrieren bewahren. Diese bildeten neue Hyphen, die dann in Lufthyphen übergingen und Konidien abschnürten.

Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß das Weiterwachsen der *Aspergillus*-Mycelien nach dem Gefrieren nur von bestimmten lebensfähigen Zellen ausgeht.

Hier sei noch auf einen prinzipiellen Unterschied in einer Beobachtung Richters und der meinigen aufmerksam gemacht. Nach Richter ist in allen gefrorenen Hyphenzellen die Plasmolyse unmittelbar nach dem Auftauen nicht möglich, die Zellen seien also turgeszenzlos geworden. Mit der Wiederaufnahme des Wachstums müßte dann der Wiedereintritt der Turgeszenz verbunden sein.

Möglicherweise sind die einzelnen Zellen, die sich nach meinen Beobachtungen sofort nach dem Auftauen plasmolysieren lassen, bei Richters allerdings nicht bekannter Versuchsmethode der Beobachtung entgangen. Bei meinen eingangs geschilderten Versuchen ließ sich aber der Eintritt der Plasmolyse sofort nach dem Auftauen in einzelnen Zellen zweifellos feststellen, und ich möchte in Verbindung mit Klemms Ergebnissen annehmen, daß nur diese Zellen fähig sind weiter zu leben. Nun sterben aber auch von diesen Zellen noch einige in günstiger Temperatur ab (vgl. S. 10). Somit läßt sich sagen: Das Nichteintreten der Plasmolyse in gefroren gewesenen Zellen ist ein sicheres Zeichen des eingetretenen Todes; dagegen läßt sich über die Zellen, die sich plasmolysieren lassen, unmittelbar nach dem Auftauen noch nicht sicher urteilen, ob sie weiterleben werden oder nicht.

Es sind also nach dem Gefrieren folgende drei Arten von Zellen im Mycel von *Aspergillus niger* vorhanden: 1. solche, die unverkennbar abgestorben sind, 2. solche, die sich noch plasmolysieren lassen, bei denen aber die Schädigung im Innern des Plasmas soweit gegangen ist, daß selbst günstige Temperatur sie nicht retten kann und 3. Dauerzellen, ebenfalls plasmolysierbar, die mit Hilfe günstiger Temperatur die innere Schädigung überwinden und dann weiter wachsen (vgl. S. 14).

II. Die Lebensdauer der resistenten *Aspergillus*-Zellen in ungünstigen Temperaturbedingungen.

Die vorhergehenden Erörterungen haben uns gezeigt, wie notwendig günstige Temperaturverhältnisse für die Wiederaufnahme

der Lebenstätigkeit in den Dauerzellen sind. Es fragt sich nun, ob diese Zellen bei mäßiger Temperatur (+ 4° C) in ihrem Schwächezustande längere Zeit verharren können, bevor günstige Temperatur sie zur Bildung neuer Hyphen veranlaßt, und wann sie absterben.

Aus Tabelle III (S. 13) ist zu ersehen, daß langsamer Übergang von der Gefriertemperatur zu + 20° C und + 32° C keinen hemmenden Einfluß auf den Fortgang der Desorganisation hat; zugleich wurde bemerkt, daß die Zahl der überlebenden Zellen abnimmt. Diese Daten geben auch einigen Aufschluß über die Lebensdauer der resistenten Zellen. Sie hängt natürlich von dem Maße der Schädigung ab, welche die Zellen durch die Temperaturerniedrigung erfahren haben, d. h. von der Dauer der Abkühlung. So wachsen (Tabelle III, S. 13) nach 2½stündigem Gefrieren diese resistenten Zellen selbst nach 68stündigem Aufenthalte bei + 4° C beim Erwärmen auf + 32° C wieder aus; nach 6 Stunden Kältewirkung muß die höhere Temperatur mindestens nach 35—40 Stunden einsetzen, da sonst die Desorganisation des Zellinhaltes eintritt, und bei 24stündigem Abkühlen sind die Dauerzellen nach weiteren 24 Stunden Aufenthalt im Eisschranke (+ 4° C) kaum noch lebensfähig.

Diese hier bestehende Beziehung zwischen Lebensfähigkeit und Temperaturbedingungen bestätigt die Richtigkeit der Annahme, daß auch die „Dauerzellen" eine Schwächung erfahren haben und mit Hilfe günstiger Temperatur zur normalen Funktion des Protoplasten zurückgeführt werden (Pfeffer, II, S. 284). Der Eingriff einer günstigen Temperatur kann auch nach gewissen Zeiträumen noch belebend wirken.

III. Einfluß von wiederholtem Gefrieren auf die resistenten Zellen.

Die häufigen Temperaturschwankungen in der Natur können es mit sich bringen, daß Pflanzen in kurzen Zeiträumen wiederholt Temperaturen unter 0° ausgesetzt werden, und es ist denkbar, daß kurz aufeinander folgende Abkühlungen mit dazwischen liegender Erwärmung größere Schädigungen verursachen, als wenn eine einmalige Abkühlung von entsprechend längerer Dauer erfolgt.

Größeres Interesse widmete zuerst Göppert (1830, S. 62) dieser Frage. Seine Versuche ergaben, daß die Pflanzen bei wiederholtem Gefrieren und Auftauen im allgemeinen schon bei Kälte-

graden oberhalb ihres normalen Erfrierpunktes absterben. Apelt (1907, S. 258) und Irmscher (1912, S. 432) bestätigten durch weitere Versuche diese Beobachtung. Neuere Untersuchungen, die diese Frage betreffen, stammen von Albert Winkler (1913, S. 495), welcher untersuchte, wie oft die Bäume wiederholtes Gefrieren und Auftauen aushalten. Er wandte zu diesen Versuchen eine Temperatur an, die durchschnittlich 8° höher lag, als der Erfrierpunkt. Die Bäume ertrugen selten eine 6malige Abkühlung auf — 13° C, während sie einer einzigen Kältewirkung von — 20° C standhielten. Somit ist auch für unsere Laubbäume und Immergrünen, die durchschnittlich etwas widerstandsfähiger sind, der schädigende Einfluß wiederholten Gefrierens und Auftauens nachgewiesen. Aber schon Pfeffer (II, S. 300) macht auf die Tatsache aufmerksam, daß im Hochgebirge an sonnigen Abhängen viele Pflanzen fast täglich gefrieren und schnell auftauen und diese Temperaturschwankungen schadlos ertragen. Das läßt auf ein sehr großes Anpassungsvermögen dieser Typen schließen. — In Anbetracht der hohen Kälteresistenz der Dauerzellen im *Aspergillus*-Mycel war zu untersuchen, ob diese Zellen wiederholtes Gefrieren ertragen.

Bekanntlich ist das Protoplasma lebender Zellen durch Anilinblau nicht färbbar. Wenn also die Kulturen nach dem ersten Gefrieren mit Anilinblau behandelt wurden, dann mußten die Dauerzellen ungefärbt bleiben und für das zweite Gefrieren als lebende Zellen kenntlich sein.

Nachdem die Kulturen (48 Stunden alte) $4^1/_2$ Stunde bei — 11° C teils gefroren, teils unterkühlt waren, wurden sie ca. 17 Stunden bei + 23° C gehalten. Es mußte dann nach früheren Erfahrungen in allen geschädigten Zellen die Desorganisation eingetreten sein, während die lebenden Dauerzellen in dieser Zeit nur teilweise neue Hyphen bilden konnten. Diese Vermutungen erwiesen sich in einigen Vorversuchen als richtig. — Nach dieser Wärmeperiode wurden also die Mycelien vorsichtig mit Anilinblau gefärbt, — die Dauerzellen blieben ungefärbt — und hierauf in neuer Nährlösung wieder der Kälte ausgesetzt und zwar nur eine Stunde (− 11° C). Nach der ersten Kältewirkung waren einige Kulturen unterkühlt geblieben, und bei einigen von diesen trat auch bei der zweiten Abkühlung keine Eisbildung ein. Es wurden bei diesem Versuche also einige Kulturen zweimal unterkühlt, andere das erste Mal unterkühlt, das zweite Mal zum Gefrieren gebracht und schließlich einige Kulturen zweimal der Eisbildung ausgesetzt.

Tabelle V (*Aspergillus niger*, zweimal gefroren).

Alter der Kultur	Gefriertemperatur °C	Dauer des Gefrierens	Weiter kultiviert: Temperatur °C	Weiter kultiviert: Zeitdauer	Ergebnis der Beobachtungen
30 Std.	— 11°	4½ Std.	—	sofort untersucht	Gefrorene Kultur: Protoplasma körnig, färbbar[1]), ca. 10 % nicht färbbare Zellen mit Vakuolen, diese Zellen lassen sich plasmolysieren.
„	„	„	—	„	Unterkühlte Kultur: Plasma körnig, Vakuolen in allen Zellen vorhanden, Zellen nicht färbbar mit Anilinblau.
„	„	„	+ 25°	17 Std.	Gefrorene Kultur: Desorganisation fast in allen Zellen eingetreten, die überlebenden Dauerzellen sind deutlich sichtbar, teilweise mit kurzen, neuen Hyphen.
„	„	„	„	„	Unterkühlte Kultur: Dauerzellen oft 3—8 miteinander verbunden. Teilweise Bildung kurzer Hyphen. In den übrigen Zellen ist Desorganisation eingetreten.
30 Std.	— 11°	4½ Std.	+ 25°	17 Std.	Unterkühlt gewesen, wieder unterkühlt: Bildung neuer Hyphen aus Dauerzellen; diese ertragen also zweimaliges Unterkühlen!
	gefärbt[1]) und wieder gefroren:				
	— 11°	1 Std.	+ 25°	28 Std.	
„	„	„	+ 25°	28 Std.	Unterkühlt gewesen, dann gefroren: Einzelne wenige Dauerzellen mit kurzen, neuen Hyphen sind durch das zweite Abkühlen getötet. Bildung neuer Hyphen aus anderen Dauerzellen!
„	„	„	+ 25°	28 Std.	Zweimal gefroren: Alle Zellen desorganisiert, färbbar[1]), kein Zuwachs.

1) Vgl. Anmerkung Tab. I, II und III.

Die Dauerzellen ertrugen sowohl zweimaliges Unterkühlen, als auch Unterkühlung mit nachfolgendem kurzen Gefrieren, denn nach Verlauf von 15—20 Stunden bei + 25° C nach dem zweiten Abkühlen hatten die ungefärbten Dauerzellen neue Hyphen gebildet. Nach zweimaliger Abkühlung mit Eisbildung waren dagegen alle Zellen der Kulturen abgestorben. Tabelle V (S. 27) gibt nähere Einzelheiten an.

Trotz ihrer Widerstandsfähigkeit gegen zweimaliges Unterkühlen werden also die Dauerzellen durch wiederholtes Gefrieren meist getötet. Auch hier ist die Schädigung durch das Gefrieren größer als durch Temperaturerniedrigung bei Unterkühlung.

IV. Die Bedingungen für die Bildung der resistenten Zellen.

Das Hauptergebnis der bisherigen Untersuchungen ist die Tatsache, daß einzelne Zellen des *Aspergillus*-Mycels auffallende Kälteresistenz besitzen. Interessant ist hierbei, daß den älteren Zellen die größere Widerstandsfähigkeit zukommt. Es ist dies eine Abweichung von der Erfahrung, daß vielfach das Plasma embryonaler Zellen durch die Kälte weniger beeinflußt wird. Wir haben schon eingangs Beispiele hierfür kennen gelernt.

Ist es nun möglich, für unsere Dauerzellen die Faktoren zu präzisieren, die eine erhöhte Resistenz bedingen?

Nach den Untersuchungen Maximows und Bartetzkos ist eine Steigerung der Kälteresistenz durch Erhöhung der osmotischen Leistung in der Zelle möglich und aus früher erwähnten Beobachtungen, u. a. von Lidforss, geht hervor, daß auch in der Natur in den Pflanzen, die der Winterkälte ausgesetzt sind, oft Stoffwandlungen eintreten, die gleichfalls eine Turgorsteigerung bedingen. Der Stoffwechselprozeß wird in diesen Fällen durch die tiefe Temperatur so beeinflußt, daß die Bildung von „Schutzstoffen“ erfolgt. Ein weiteres Beispiel für den geänderten Stoffwechsel bietet uns das Verhalten kaltlagernder Kartoffeln. Bei 0° bis + 6° C geht die Stärke teilweise in Zucker über (Müller-Thurgau, 1882, S. 751). Auch Schaffnit vermutet nach seinen Untersuchungen, daß bei der Abkühlung der Stoffwechsel und damit zugleich der Zustand des Protoplasten eine Änderung erfährt. Er sagt (1910, S. 143): „Bei Temperaturen nahe dem Nullpunkte erfolgen in der pflanzlichen Zelle chemische Stoffumlagerungen, die einen Übergang labiler Verbindungen in stabilere Form repräsen-

tieren und lediglich ökologische Bedeutung haben." Dieselbe Ansicht spricht Loew aus (1885, S. 515). Hierin liegt in den Hauptzügen die Erklärung für das Anpassungsvermögen der Pflanzen an die Kälte. Experimente von Göppert (1830, S. 63), Apelt (1909, S. 226) und Rein (1908, S. 21) haben bewiesen, daß eine Gewöhnung der Pflanzen an niedrige Temperaturen möglich ist, daß also der Erfrierpunkt von den vorausgegangenen Temperaturbedingungen abhängt. Auch Haberlandt (1877, S. 48) machte die Beobachtung, daß Pflanzen, die längere Zeit in einem Warmhause gestanden hatten, leichter erfroren als solche, die etwa bei + 8° C kultiviert worden waren. Es handelt sich also bei der Anpassung an tiefe Temperaturen um eine Erfrierpunktserniedrigung. Irmscher (1912, S. 436, Tab. 20) beobachtete an verschiedenen Laubmoosen, daß der Erfrierpunkt nach 5tägigem Verweilen der Objekte bei + 5° C sich durchschnittlich um — 5° verschiebt. Gleiches fand A. Winkler auch für unsere einheimischen Bäume. Knospen von *Fagus silvatica* und *Quercus pedunculata*, die bei — 22° C (im Winter) erfrieren (1913, S. 480, Tab. VII), halten eine Temperatur von — 25° und — 30° C aus, wenn sie innerhalb 13 Tagen langsam auf — 30° bis — 32° C bei Eisbildung abgekühlt werden. Dasselbe gilt für *Corylus*, *Fraxinus*, *Populus* u. a., auch für Immergrüne (1913, S. 488, Tab. XIV).

Aus der Gesamtheit der bisher angeführten Ergebnisse steht die Akkommodationsfähigkeit des Protoplasmas an niedere Temperaturen außer Zweifel.

Wenn wir die aus diesen Beobachtungen gewonnenen Erfahrungen auf unser Objekt übertragen, so würde das bedeuten, daß die Zahl der Dauerzellen sich vergrößert, wenn das Protoplasma vor dem Gefrieren eine stabilere Form annehmen kann.

Versuche, die einen Beweis für diese Annahme bringen könnten, habe ich nicht ausgeführt. Aus den vielen positiven Ergebnissen, die an den verschiedensten Objekten erhalten wurden, glaube ich schließen zu können, daß empirische Untersuchungen an Schimmelpilzen zu dem gleichen Ergebnisse führen würden, so daß also die der Kältewirkung vorausgehenden Temperaturbedingungen einen wichtigen Faktor für die Bildung der Dauerzellen darstellen dürften.

Die vorhandene ungleiche Resistenz der einzelnen Zellen desselben *Aspergillus*-Mycels offenbart sich in unseren Versuchsreihen, auch ohne daß eine Beeinflussung durch die Temperatur

in obigem Sinne stattgefunden hat. Hier sind also andere Faktoren wirksam.

Nun ist ja, wie anfangs betont wurde, mit der Erhöhung der osmotischen Leistung der Zelle eine größere Kälteresistenz verknüpft. Diese Tatsache konnte auch ich an einer Versuchsreihe beobachten, bei der ich *Aspergillus* auf 25proz. Rohrzucker-Nährlösung kultivierte. Das Mycel entwickelte sich erst in 3 Tagen zu gleicher Größe, wie sie die Mycelien der anderen Versuche besaßen.

Nach 24stündiger Kältewirkung von — 14° C und nach 48stündiger von — 11° (— 8°) C war zwar die Zahl der lebenden Zellen auf ungefähr 5 % herabgesetzt, aber alle Kulturen blieben lebensfähig.

In 2 Tage alten *Aspergillus*-Kulturen, die in 5proz. Zucker-Nährlösung gewachsen waren, waren dagegen höchst selten nach 48stündiger Gefrierdauer noch lebende Zellen zu finden (vgl. S. 23).

Mit Rücksicht auf die ungleiche Resistenz der einzelnen Zellen desselben Mycels liegt hiernach die Vermutung nahe, diese Differenz in der Widerstandsfähigkeit gegen Kälte auf eine verschiedene Verteilung der osmotischen Leistung in den Zellen zurückzuführen, wobei den Dauerzellen der höchste Turgor zukommen müßte. Ich stellte deshalb plasmolytische Versuche an, konnte aber die Vermutung nicht bestätigt finden. Nach Pantanelli (1904, S. 320) (vgl. auch Bartetzko, 1910, S. 87) kommt den Spitzenzellen der höchste Turgor zu, eine Tatsache, die ich selbst beobachten konnte. Nach den früheren Beobachtungen von Bartetzko und auch nach meinen Versuchsergebnissen sind aber die Spitzenzellen gerade die ersten, die durch die Kälte geschädigt werden. Allerdings ist zu bedenken, daß bei Zugabe der isotonischen Salpeterlösung nicht allein die osmotische Leistung bestimmt wird, sondern der Turgor, der eine Summe aus Turgordehnung, Quellungskraft, Zentraldruck und osmotischer Leistung darstellt. Pantanelli hat diese Frage speziell für Pilzhyphen erörtert. Er nimmt an (1904, S. 313, 319), daß in älteren Zellen eine Überführung gequollener Substanz, wie sie in dem embryonalen Plasma der Spitzenzellen vorhanden sein soll, in gelöste stattfindet, und daß dadurch in den älteren Zellen speziell der osmotische Druck zunehmen kann, wenn auch der Gesamtturgor sich verringert. Es ist aber sehr zweifelhaft, ob eine so geringe Differenz in der osmotischen Leistung die oft beträchtliche Kälteresistenz der einzelnen Zellen bedingen kann, selbst wenn zwischen Erhöhung der osmotischen

Leistung und Erhöhung der Kälteresistenz kein einfaches Verhältnis besteht.

Wie alle diese Erörterungen zeigen, sind wir bei der Festlegung der Faktoren für die größere Resistenz der älteren Hyphenzellen nur auf Vermutungen angewiesen, und die Frage muß zurzeit noch offen bleiben. Sie kann erst beantwortet werden, wenn der Kältetod in seinen Einzelheiten erklärt ist, d. h. wenn es möglich wird, tiefer in den Mechanismus und Chemismus des Protoplasten einzudringen.

D. Versuche mit *Penicillium glaucum, Phycomyces nitens* und *Rhizopus nigricans.*

Bartetzko (1910, S. 75) stellte für *Penicillium glaucum* die gleiche Kälteresistenz fest, wie für *Aspergillus niger.* Für *Phycomyces nitens* dagegen liegt nach den Angaben dieses Forschers der Erfrierpunkt bedeutend näher dem Nullpunkte. In 20proz. Taubenzucker-Lösung waren nach 2stündigem Gefrieren bei — 5 ° C alle Objekte abgestorben (Bartetzko, 1910, S. 77, Tab. X).

Das Temperaturoptimum für *Penicillium* liegt ungefähr bei + 25 ° C. Bei dieser Temperatur kultivierte ich diesen Pilz als Submersmycel nach der für *Aspergillus* beschriebenen Methode. Die Tabelle VI, S. 32 zeigt, daß *Penicillium* in seinem Verhalten bei Temperaturerniedrigung und nachfolgender Erwärmung ganz dem *Aspergillus niger* gleicht. Selbst nach 22stündiger Einwirkung von — 10,5 ° C waren noch lebende Zellen vorhanden (vgl. Fig. 3). Auch bei diesem Pilze beschränkt sich also die größere Widerstandsfähigkeit gegen Kälte auf einzelne Zellen.

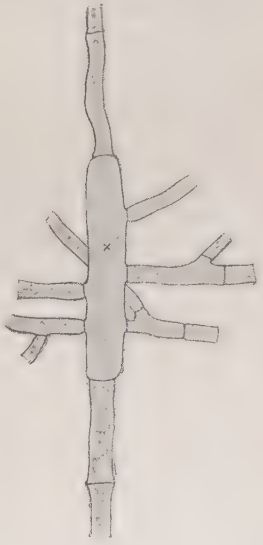

Fig. 3.
Penicillium-Mycel, 22 Stunden bei — 10 ° C unterkühlt. ×: „Dauerzelle", die nach 24 Stunden bei + 25 ° C an fünf Stellen ausgewachsen ist.

Wenn wir im vorhergehenden Abschnitte dazu gelangt sind, dem Plasma der Dauerzellen einen besonderen (stabileren) Zustand zuzuschreiben, so ist einleuchtend, daß bei *Phycomyces*, in dessen Hyphen Querwände nicht vorhanden sind, der Resistenzgrad des Protoplasmas überall

der gleiche sein wird, zumal da durch die lebhafte Protoplasmaströmung eine konstante Mischung des Inhaltes erfolgt.

Tatsächlich tritt bei *Phycomyces nitens* schon durch kurz andauernde Kältewirkung die Desorganisation gleichzeitig in allen Teilen des Mycels auf. Sie äußert sich ebenfalls in einer Granulation und dem nachfolgenden Kollaps des Protoplasten. Die hierbei angewandte Temperatur von — 10° C lag allerdings bedeutend unter dem von Bartetzko (1910, S. 77) für *Phycomyces* gefundenen Erfrierpunkte. Ich benutzte sie aber deshalb, weil ich einen Vergleich zum Verhalten des *Aspergillus*-Mycels anstellen wollte, und weil die für *Aspergillus niger* angewandte Temperatur von — 12° bis — 14° C auch bedeutend unter dem Erfrierpunkte der Mehrzahl aller Zellen lag.

Tabelle VI *(Penicillium glaucum).*

Alter der Kultur	Gefriertemperatur °C	Dauer des Gefrierens	Weiter kultiviert: Temperatur °C	Weiter kultiviert: Zeitdauer	Ergebnis der Beobachtungen
48 Std.	—	—	—	—	Kontrollkultur: Wie *Aspergillus*-Kultur: homogenes Plasma mit Vakuolen!
„	— 10,5°	4½ Std.	+ 4° hierauf + 25°	15 Std. 24 Std.	Desorganisation weitgehend, Zellinhalt mit Anilinblau färbbar[1]), wenig lebende Zellen mit neu gebildeten Hyphen.
„	„	„	+ 25°	15 Std.	Desorganisation geringer als im vorhergehenden Versuche, Zuwachs aus Dauerzellen bedeutend.
48 Std.	— 10,5°	22 Std.	—	sofort untersucht	Unterkühlte Kultur: Zellen mit körnigem Plasma und mit Vakuolen. Plasmolyse möglich.
„	„	„	+ 25°	24 Std.	Unterkühlte Kultur: Zellen mit desorganisiertem Inhalte, färbbar[1]) mit Anilinblau. Einzelne Dauerzellen mit Zuwachs an vielen Stellen (vgl. Fig. 3, S. 31). Plasmolyse bei 15 % KNO_3.
„	„	„	+ 25°	24 Std.	Gefrorene Kulturen: Mycel fast in allen Teilen desorganisiert; Zuwachs neuer Hyphen nur gering.

1) Vgl. Anmerkung Tab. I, II und III.

Auch in den Mycelien von *Rhizopus nigricans* waren nach kurzer Kältewirkung alle Teile der Hyphen abgestorben. Ein Weiterleben einzelner bestimmter Mycelteile wurde nie beobachtet.

Auch diese Versuche zeigen, daß in keinem Falle eine gute Wachstumstemperatur die Wiederaufnahme der normalen Tätigkeit in den Hyphen mit kollabiertem Inhalte hervorruft. Wir treffen somit bei *Phycomyces* und *Rhizopus* das gleiche Verhalten, wie wir es für die Mehrzahl der Zellen des *Aspergillus*-Mycels kennen lernten. Dies ist ein weiterer Beweis, daß die durch inframinimale Temperatur bewirkten Konfigurationsänderungen des Protoplasten, die mit dem Verluste des Turgors in der Zelle eintreten, und auch der Kollaps des Zellinhaltes nie ausgleichbar sind, daß also mit dem Schwinden des Turgors der Tod eintritt.

II. Teil.

Der Atmungsvorgang im Mycel von *Aspergillus niger* nach dem Gefrieren.

Wenn im Mycel des *Aspergillus niger* nach dem Gefrieren resistente Zellen vorhanden sind und diese unter günstigen Temperaturbedingungen neue Hyphen bilden, so muß dieser Umstand notwendigerweise zur Folge haben, daß mit der gesteigerten Produktion der Pilzmasse auch eine Steigerung der Atmungsgröße eintritt. Wie Kunstmann (1895) feststellte, nimmt aber die Atmungsintensität auch in den Entwicklungsstadien des Pilzes zu, d. h. auch die von einem Gewichtsteile Decke in der Zeiteinheit produzierte Kohlensäuremenge wird immer größer. Sie nimmt auch noch zu, wenn die Atmungskurve für die gesamte Decke infolge der abgeschlossenen Pilzmasseproduktion sinkt. Ergibt sich also, bei der Atmungsbeobachtung an einer Pilzdecke eine Steigung der Kurve, so stellt dieses Wachsen der Atmungsintensität die Summe dar aus der Steigerung der Atmung infolge der inneren Umgestaltung und Bildung von Stoffwechselprodukten einerseits und der Bildung neuer Hyphen andererseits.

Nach Richter ist nun auch im gefroren gewesenen *Aspergillus*-Mycel eine Steigerung der Atmungsintensität vorhanden, wenn das Mycel bei $+30^{0}$ C weiter kultiviert wird. Sie beruht nach der

Ansicht dieses Forschers zum größten Teile auf der Wiederaufnahme der Stoffwechselprozesse in der Pilzdecke. Die sich neu bildenden Hyphen hätten hiernach anfangs nur geringen Anteil an der gesteigerten Kohlensäureabgabe. Richter wurde zu diesem Schlusse geführt durch die Beobachtung der schnellen Zunahme der Atmungsgröße. Eine solche Steigerung der Atmung könne nicht allein durch neu gebildete Hyphen bewirkt werden; denn auskeimende Sporen oder überlebende Zellen könnten in so kurzer Zeit nicht die erforderlichen Mengen Mycel bilden.

Die Beobachtung des Desorganisationsverlaufes in den gefrorenen *Aspergillus*-Zellen hat uns schon von dem irreparablen Zustande der turgeszenzlosen desorganisierten Zellen überzeugt, so daß von vornherein eine Wiederaufnahme der Atmungstätigkeit in diesen Zellen ausgeschlossen erscheint, und in der Tat zeigte eine Anzahl von mir durchgeführter Versuche, daß Richters Folgerung keineswegs zwingend ist und der beobachtete Verlauf der Atmungskurve auf andere Weise zustande kommt.

A. Methodik.

Um die Änderung der Atmungsintensität in Pilzmycelien nach der Kälteperiode bei optimaler Temperatur verfolgen zu können, mußte ich eine größere Pilzmasse beobachten, als bei den Versuchen im I. Teile, da die absoluten Mengen der von jenen kleinen submersen Mycelien umgesetzten Gase im Verhältnis zum Gasraume der Kulturgefäße zu gering waren, um eine genaue Bestimmung zu erlauben. Ich erzog deshalb eine Myceldecke von *Aspergillus niger* in einem Erlenmeyer-Kolben auf 50 ccm Nährlösung. Eine solche Pilzmasse atmete sehr energisch. Ich konnte die Atmung gut verfolgen, indem ich in gewissen Zeiträumen den Kohlensäure- und Sauerstoffgehalt der Luft in dem Kulturgefäße bestimmte. Da es sich um die Beobachtung des Wechsels der Atmungsintensität an je einer Kultur handelte, so genügte die Bestimmung relativer Gasmengen, d. h. es war nur nötig, den jeweiligen Prozentgehalt der Luft an Kohlensäure und Sauerstoff zu wissen. Aus den gefundenen Daten für die stündliche CO_2-Produktion und den Sauerstoffverbrauch wurden die im folgenden dargestellten Kurven konstruiert.

Die Luftanalysen wurden in dem Apparate von Bonnier und Mangin ausgeführt. Nach einiger Einarbeitung in die Methode des Analysenganges ist es möglich, den Prozentgehalt der zu unter-

suchenden Luft innerhalb 20—25 Minuten genau zu bestimmen (Fehlergrenze 0,5 %). Es erübrigt sich, auf eine Beschreibung des Apparates einzugehen, ich verweise hier auf Bonnier und Mangin (1884, S. 294), Schmidt (1902, S. 10) und Thoday (1913, S. 567). Bezüglich der Meinungsverschiedenheiten darüber, wo in dem Apparate die Absorption der Gase durch Kalilauge und alkalisch. Pyrogallol vor sich gehen soll, möchte ich bemerken, daß mir die Absorption in der kugeligen Erweiterung der Kapillare als am sichersten erscheint. Schmidt (1902, S. 11) hat mit den von ihm angewendeten Lösungen zur Absorption genaue Resultate erzielt, ich habe deshalb Absorptionsflüssigkeiten von gleicher Konzentration verwendet (15 % Kalilauge, 10 % Pyrogallussäure) und konnte gleichfalls Bestimmungen ausführen, die in bezug auf Genauigkeit befriedigten.

Bei der Bestimmung der zu analysierenden Luftmenge muß stets Sorge getragen werden, daß an beiden Enden der Luftsäule eine kleine Menge Wasser zwischen Quecksilber und Luft eingeschaltet ist, so daß stets der Meniskus Luft—Wasser und später Luft—Kalilauge, Luft—Pyrogallol abgelesen wird. Schmidt hatte die Erfahrung gemacht, daß Wasser mit Vorteil durch eine 2proz. Kochsalzlösung zu ersetzen sei, da mit dieser Lösung Unterbrechungen der Quecksilbersäule durch adhärierende Feuchtigkeit besser vermieden werden. Ich habe diese Salzlösung mit gleichem Erfolge als Absperrflüssigkeit verwendet. Die Kapillare des Apparates war durch zwei Glasplatten ober- und unterhalb vor der Erwärmung durch die Atemluft und durch die Hand geschützt. Auf der oberen Glasplatte wurde eine Visierröhre bewegt, die in einem großen Korkstopfen senkrecht zur Glasplatte fixiert war und dazu diente, den Ablesewinkel des Auges über der Skala konstant zu halten (Schmidt, 1902, S. 10). Der Gang der Analyse ist folgender: Der Apparat wird mit etwas NaCl-Lösung ausgewaschen, eine keine Luftmenge (ca. 500—550 Teilstriche der Skala) eingesogen und solange durch die Kapillare bewegt, bis die Länge der Luftsäule nach mehreren Ablesungen konstant ist. (Es ist hierbei nötig, die Luftmenge sehr langsam durch die Kapillare zu bewegen und jede Unterbrechung des Quecksilberfadens zu vermeiden.) Die Ablesung erfolgt auf 0,5 Teilstrich genau. Zur Absorption der Kohlensäure wird etwas 15proz. Kalilauge (etwa 40 Teilstriche) in den Apparat gebracht, und dann wird das Volumen der kohlensäurefreien Luft genau abgelesen. Nun wird

noch eine kleine Menge (ca. 20 Skalenteile) 10proz. Pyrogallussäure-Lösung in den Apparat gesogen, und es erfolgt jetzt die Absorption des Sauerstoffes. Aus der Längenänderung der Gassäule wird die Menge der Kohlensäure und des noch vorhandenen Sauerstoffes in Prozenten berechnet. Der Prozentgehalt des noch vorhandenen Sauerstoffes wird vom Sauerstoffgehalte der Luft abgezogen, woraus sich der O_2-Verbrauch des Pilzes ergibt. Bestimmungen des Sauerstoffgehaltes der Laboratoriumsluft ergaben nur geringe Schwankungen innerhalb der Fehlergrenze von dem bekannten Werte 20,84 % (Bunsen, Gasometrische Methoden, 1877, S. 94). Dieser Wert wurde deshalb den Bestimmungen zugrunde gelegt. Nach Beendigung der Analyse wird der Apparat mit 10proz. Salzsäure, Wasser und Kochsalzlösung gereinigt.

Ich will im folgenden Kapitel davon absehen, die vielen Zahlen der einzelnen Ablesungen wiederzugeben und führe an dieser Stelle deshalb ein Beispiel der Berechnung an.

Atmungstätigkeit innerhalb 2 Stunden:

Länge der Luftsäule	528,5
„ „ „ nach der Absorption von CO_2 . . .	455,0
	73,5,

das sind also für den eben genannten Zeitraum 13,91 %, so daß also die stündliche Kohlensäureproduktion 6,95 % beträgt.

Länge der Luftsäule vor der O_2-Bestimmung	455,0
„ „ „ nach der Absorption von O_2 . . .	429,5
	25,5 = 4,83 %.

Diese 25,5 Teilstriche entsprechen der Sauerstoffmenge in 528,5 Skalenteilen Luft, also restieren 4,83 % Sauerstoff. Mithin hat die Pilzdecke 20,84 — 4,83 = 16,00 % in 2 Stunden, also stündlich 8,00 % Sauerstoff konsumiert.

Korrektionen, wie Berücksichtigung des Kohlensäuregehaltes der atmosphärischen Luft, Berücksichtigung des Luftdruckes, der Temperatur konnten bei der Bestimmung dieser relativen Gasmengen, die nur als Vergleichswerte dienen sollten, wegfallen.

Aus solchen Daten sind die später angeführten Kurven aufgestellt. Dabei stellt die punktierte Linie die Sauerstoffkurve dar. Längs der Abszisse sind für die Kurvenpunkte die zugehörigen

Werte für die Prozentgehalte der Gase angegeben. Außerdem finden sich längs der Abszisse noch die Stundenzahlen für die Durchlüftungsdauer und Atmungsperiode. Z. B. 14 ⊥ 2 heißt: Die Kultur wurde nach der letzten Luftanalyse 14 Stunden durchlüftet und dann der Luftraum auf 2 Stunden abgeschlossen. Auf der Ordinate sind die Prozentwerte der Analysenresultate aufgetragen.

Als Kulturgefäße für die Pilzdecken verwendete ich Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Glas von ca. 200 ccm Rauminhalt. In jedes Gefäß wurden genau 50 ccm Nährlösung gefüllt. Der Kolben wurde mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen, durch den zwei rechtwinklig gebogene Kapillarröhren führten (vgl. Fig. 5 *K*, S. 38). Nach angestellten Messungen war nach Einfügen des Stopfens mit den Glasröhren ein Luftraum von 170 ccm vorhanden. Die rechtwinklig gebogenen Glasröhren im Stopfen dienten zur Durchleitung eines konstanten Luftstromes durch die Kultur. Mit Quetschhähnen wurden die Kulturgefäße nur für bestimmte Zeit abgeschlossen. — Ich verteilte nun in jedes Gefäß eine Platinöse voll *Aspergillus*-Sporen gleichmäßig über die Oberfläche und ersetzte dann den Watteverschluß durch den Gummistopfen. Es war wesentlich, für einen konstanten Strom feuchter Luft zu sorgen, da unter dieser Bedingung die Sporenbildung gehemmt wird.

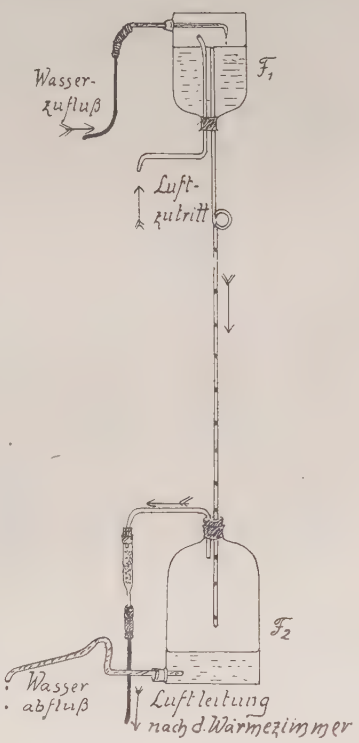

Fig. 4. Durchlüftungsapparat.

Dabei atmete das Mycel nach 40 Stunden so intensiv, daß nur für 1—2 Stunden der Kulturraum abgeschlossen werden durfte, um nicht zu weitgehenden Sauerstoffverbrauch oder intramolekulare Atmung zu bewirken. Die Kulturen wurden also immer 10—16 Stunden durchlüftet, dann auf 1—2 Stunden abgeschlossen und nun die Luftproben entnommen.

Bevor ich dazu übergehe, von dem Apparate für die Entnahme der Luftproben zu sprechen, will ich an der Hand der Fig. 4 einiges

über den Durchlüftungsapparat sagen. Dieser ist nach dem Prinzip eines Tropfaspirators gebaut. Dabei wird die Luft durch die Kulturgefäße gepreßt. Um aber Luft von hohem Feuchtigkeitsgehalte über die Pilzdecke zu leiten, sind sowohl das eigentliche Tropfgefäß F_1, als auch das Reservoir zur Aufnahme des Ablaufwassers F_2 genügend groß gewählt, um für das Wasser eine große Verdunstungsfläche zu erzielen. Durch die Ausflußregulation am unteren Gefäße F_2 fließt das Wasser in dem Maße ab, wie es durch die Tropfröhre zufließt. Die Pilzkulturen befanden sich im Kellergeschoß des Institutes im Wärmezimmer bei der konstanten Temperatur von $+ 32^0$ C. Vom Durchlüftungsapparate führte am Wasserleitungsrohr entlang durch den Fußboden nach dem Wärmezimmer

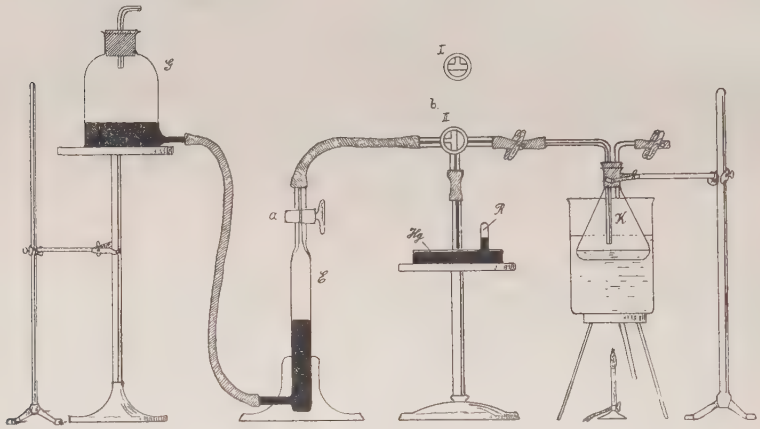

Fig. 5. Apparat zur Entnahme von Luftproben aus den Kulturgefäßen.

ein dünnes Bleirohr, an das die Kulturen angeschlossen wurden. Der Luftstrom war regelmäßig und ziemlich stark, denn die Länge der Tropfröhre betrug 120 cm.

Zur Entnahme der Luftproben aus den Kulturgefäßen konstruierte ich mir eine Apparatur, die im Prinzip der von Bonnier (1884, Bd. XVII, Taf. XVII) angewendeten gleicht. Es genügt deshalb, auf obenstehende Fig. 5 hinzuweisen. Zur Erläuterung sei nur gesagt, daß durch Senken des Quecksilberbehälters G und bei Stellung I des Zwei-Wege-Hahnes b die Luft aus dem Kulturgefäße K in das Eudiometer E gezogen werden kann. Wird dann das Eudiometer bei a verschlossen, das Quecksilbergefäß G hochgestellt und der Hahn b in die Stellung II gebracht, dann kann

die Luft in ein mit Quecksilber gefülltes Probierröhrchen *R* (Länge 6 cm, Durchmesser 13 mm) gedrückt werden. Die Röhrchen mit den Luftproben wurden in einer Schale über Quecksilber aufbewahrt (vgl. Figur bei Thoday, 1913, S. 571). Schließlich sei noch erwähnt, daß die Kulturgefäße während der Entnahme der Luftproben in Wasser von + 32° C standen, um sie vor Abkühlung zu schützen und das Gleichgewicht zwischen der in Luft und der in Nährlösung gelösten Kohlensäure nicht zu verschieben.

B. Verlauf der Atmung im *Aspergillus*-Mycel nach Einwirkung von Kälte.

Schon bei der Schilderung der Methode wurde der Unterschied erwähnt, der in der Form des Mycels für die Desorganisationsbeobachtungen und des Mycels für die Atmungsbeobachtungen besteht. Während bei früheren Versuchsreihen stets ein strahliges Submersmycel verwendet wurde, handelt es sich jetzt um eine Decke dicht verwachsener Hyphen, die nur auf der Unterseite von der Nährlösung benetzt wird, also auch beim Gefrieren nur mit einer Fläche direkt der Wirkung des Eises ausgesetzt ist. Die Kulturbedingungen sind also relativ günstiger. Eine genaue mikroskopische Untersuchung der zum Atmungsversuch bestimmten Pilzdecke in ihrer ganzen Ausdehnung ist nicht möglich, wohl aber geht mit Sicherheit aus den mikroskopischen Beobachtungen der Randzellen der Decke hervor, daß im Mycel überlebende Zellen vorhanden sind. Der Prozentgehalt dieser Dauerzellen konnte aber nicht bestimmt werden.

Wenn wir bei der Diskussion der folgenden Beobachtungen auf die Ergebnisse der Untersuchungen im I. Teile zurückgreifen wollen, müssen wir den Unterschied in der Form des Mycels berücksichtigen.

Sehen wir nun, wie die Atmung nach der Kältewirkung verläuft, und welche Faktoren für eine Steigerung der Atmungsintensität in Betracht kommen.

Bei der Erledigung dieser Aufgabe war es natürlich geboten, erst eine Kurve für den Normalverlauf der Atmung aufzustellen. Kurve I (Fig. 6, S. 40) zeigt den Verlauf der Atmung innerhalb 100 Stunden[1]). Ungefähr nach 70 Stunden ist das Maximum der

1) Die punktierte Linie verbindet die Daten des stündlichen Sauerstoffverbrauches die zweite Kurve stellt die CO_2-Produktion dar. Die angeführten Stundenzahlen bedeuten Durchlüftungsdauer + Periode des abgeschlossenen Luftraumes (vgl. S. 37).

Intensität erreicht. Von nun an findet nur geringe Neubildung der Hyphen statt, der Pilz geht vom vegetativen Wachstum zur Sporenbildung über. Die Atmungsgröße sinkt. Interessant ist der Verlauf der Kohlensäure- und Sauerstoffkurve selbst. Während anfangs eine gewisse Parallelität zwischen den beiden Kurven gewahrt bleibt, steigt in der Gegend des Maximums die Sauerstoffkurve plötzlich schneller. Der größere Sauerstoffverbrauch läßt vermuten, daß neben dem gebotenen Zucker jetzt noch andere Stoffe zur Oxydation gelangen. Sicherlich ist bei dem regen Stoffwechsel der

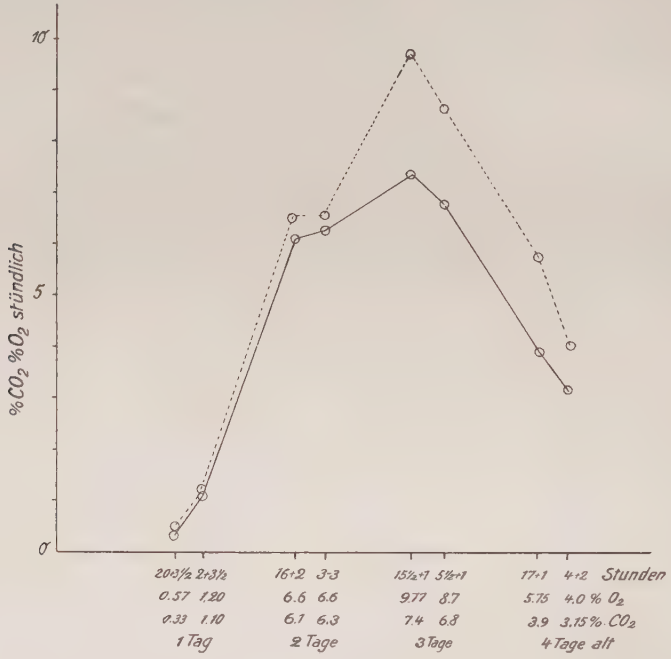

Fig. 6. Kurve I.

Schimmelpilze innerhalb dreier Tage der Zucker so weit verbraucht, daß er wohl den Bedarf an Verbrennungsmaterial nicht allein decken wird (Puriewitsch, 1900) und daß der Pilz nun anfangs gebildete Stoffwechselprodukte veratmet. Da die Nährlösung 0,4 % NH_4NO_3 enthielt, so könnte nach Wehmer[1]) (1891, S. 164) in

1) Wehmer, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1891, S. 164: Vom *Aspergillus* wird die Oxalsäure in beträchtlichen Mengen gebildet. Während nun bei mittlerer Temperatur eine vorübergehende Ansammlung der Säure stattfindet, die dann später zerstört wird, wird bei höherer Temperatur (+ 34° C) die Oxalsäure in demselben Maße gespalten,

unserem Falle auch eine Weiterspaltung vorübergehend gebildeter Oxalsäure den stärkeren Sauerstoffkonsum bewirken. Dieses Auseinandergehen der beiden Kurven wird uns auch in den anderen Versuchen entgegentreten: es ist ein Zeichen, daß der Atmungsprozeß in andere Bahnen geleitet ist.

Kehren wir nun zur eigentlichen Aufgabe zurück. Ich habe mich bei diesen Untersuchungen darauf beschränkt, Kulturen verschiedenen Alters gleicher Gefriertemperatur auszusetzen (— 10° bis — 12° C) und ihre nachträgliche Atmungstätigkeit bei optimaler Temperatur (+ 32° C) zu verfolgen.

In Kurve II (Fig. 7) sind die Atmungsgrößen einer 34 Stunden alten Kultur dargestellt, nachdem sie 14 Stunden lang in der Kälte

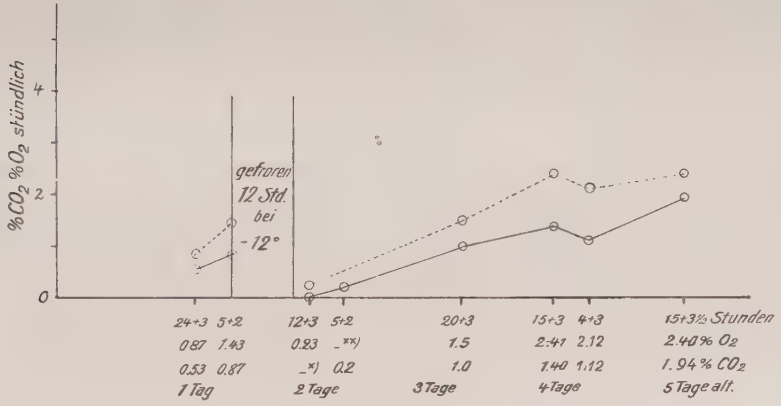

Fig. 7. Kurve II.
×) Nicht meßbare Mengen. — ××) Verunglückt.

(— 12° C) gehalten worden war. Nach dem Auftauen erreicht die Atmungsintensität erst nach 45 Stunden dieselbe Größe, die sie vor dem Gefrieren besaß. Es sind also sicher viele Zellen durch die Abkühlung getötet worden, denn die Kurve steigt sehr langsam an. Hierbei findet eine Neubildung von Hyphen statt: Die vor dem Gefrieren entwickelten Mycelinselchen zeigen nach 20 Stunden feine Ausstrahlungen von Hyphen, die sich zu einer dichten Decke vereinigen, während die ursprünglichen Mycelteile abgestorben und

wie ihre Bildung erfolgt. Dagegen findet hier eine Ansammlung geringer Mengen oxalsaurer Salze statt. Wie ein Versuch Wehmers (S. 171) zeigt, haben diese Oxalate die Fähigkeit, einen Teil der gebildeten Säure zu binden, also der Zersetzung zu entziehen. Hierbei geht das neutrale Salz in saures Oxalat über.

zu Boden gesunken sind. Diese Tatsachen konnte ich auch bei den folgenden Versuchen beobachten. — Nach insgesamt 4 Tagen ist das Maximum der Atmung in der Kultur erreicht, es tritt Sporenbildung ein. Der nachfolgende Kurvenanstieg ist der gesteigerten Atmungstätigkeit durch inzwischen gebildete und nun keimende Sporen zuzuschreiben.

Ich werde später noch einige Faktoren erwähnen, die auch eine Steigerung der Atmung nach dem Gefrieren bewirken könnten. Berücksichtigen wir vorläufig nur die überlebenden „Dauerzellen" in der Pilzdecke. Wir wissen aus den Versuchen im I. Teile dieser Arbeit, daß eine Dauerzelle gewöhnlich an 3—4 Stellen neue Hyphen bildet, also durchschnittlich schneller Pilzmasse produziert als eine Spore. Selbst wenn also nur die Dauerzellen durch Bildung neuer Hyphen die Atmungssteigerung bewirken würden, so würde schon eine kleinere Anzahl resistenter Zellen zu gleichem Ergebnisse führen, wie eine größere Anzahl von keimenden Sporen.

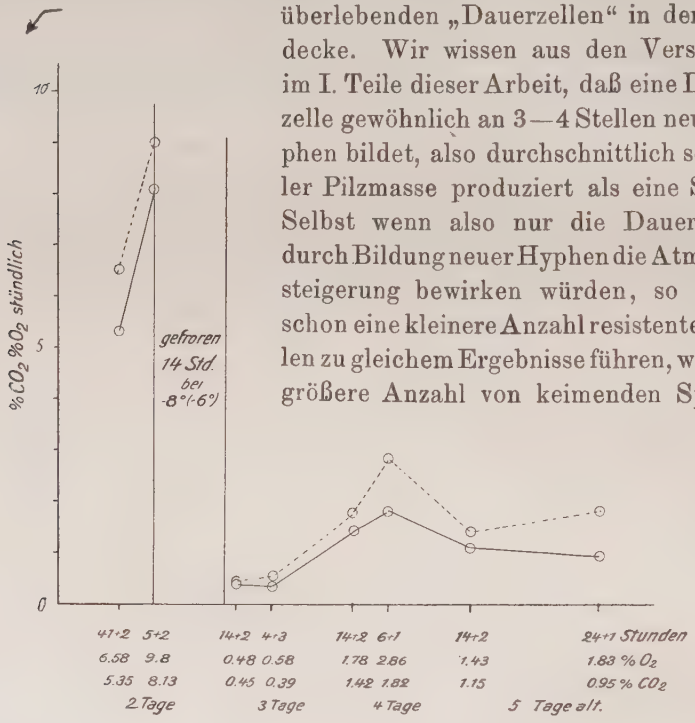

Fig. 8. Kurve III.

Da wir konstatierten (Tab. II, S. 11), daß mit fortschreitender Entwicklung der Kulturen die Zahl der resistenten Zellen zunimmt, so war für ältere Pilzdecken nach dem Gefrieren ein schnellerer Anstieg der Atmungskurve zu erwarten, da ja das neue Mycel von einer größeren Zahl Dauerzellen gebildet wird. Es wurde also eine 48 Stunden alte Pilzdecke der Kälte ausgesetzt. Nach Kurve III (Fig. 8; die Temperatur stieg während der Kälteperiode um 2° C) beträgt die stündlich produzierte CO_2-Menge vor dem Gefrieren

8,13 %, der CO_2-Verbrauch 9,08 %. Nach der Kälteperiode ist die Atmungstätigkeit auf ein Minimum reduziert. Sie nimmt nun im weiteren Verlaufe zu bis zu einem Maximum, das aber weit unter der Intensität der nichtgeschädigten Pilzdecke zurückbleibt. Der Verlauf der Kurve nach dem Gefrieren ist ähnlich dem der Kurve II, obgleich sich bei dem letzteren Versuche theoretisch eine größere Zahl von Zellen an der Neubildung des Mycels beteiligen, also auch die Kurve schneller steigen müßte. Eine Erklärung dieses Widerspruches zu der früher gewonnenen Erfahrung ist leicht möglich. Wenn wir berücksichtigen, daß innerhalb der ersten 48 Stunden ein großer Teil des Zuckers der Nährlösung vom Pilz verbraucht wird und an dessen Stelle Stoffwechselprodukte von teilweise saurem Charakter treten, so ist einzusehen, daß mit dem Schwinden des „Schutzstoffes", wie ihn der Zucker repräsentiert, auch die Kälteresistenz für viele Zellen verringert wird. Deshalb wird nur eine geringere Anzahl Dauerzellen neue Hyphen bilden. Schließlich mögen auch die Stoffwechselprodukte dazu beitragen, den Pilz kälteempfindlicher zu machen. Dazu kommt, daß das Wachstum des neuen Mycels in einer schon stark ausgebeuteten Nährlösung naturgemäß nicht so intensiv verläuft. Diese Momente kommen aber bei den früher angestellten Beobachtungen am Submersmycel in Wegfall, da dem kleinen Mycel dort eine verhältnismäßig viel größere Menge von Nährstoffen zur Verfügung steht. Der Pilz befindet sich in der früheren Versuchsanordnung in dieser Hinsicht unter günstigeren Bedingungen. Während sich dort in 3 ccm Lösung 6—10 Sporen entwickeln, kommt bei den Kulturen für die Atmungsmessung ungefähr das Hundertfache an Sporen auf 50 ccm Nährlösung.

Auch die mikroskopische Untersuchung der Randhyphen der 48 Stunden alten Pilzdecke ließ eine Wirkung der Stoffwechselprodukte auf die Zellen erkennen. Die Hyphen hatten größtenteils hefeartiges Aussehen. Diese Chemomorphose des *Aspergillus niger* tritt nach Raciborski (1905, S. 773, 777) z. B. auch nach Einwirkung von Chloroform und freiem Jod ein. Später stellte sie Ritter (1907, S. 225) auch für die Hyphen der Mucorineen fest. Bei Ritter findet sich auch auf Tafel X, Fig. 8 eine Abbildung der Hefeform des *Aspergillus*. Diese Bildung wird durch Zusatz von 0,5—0,75 % Oxalsäure zur Nährlösung erreicht.

Auch Richters Atmungsbeobachtungen am *Aspergillus*-Mycel liefern Beispiele dafür, daß die Veränderung der Nährlösung einen

Einfluß auf die Atmungsintensität hat. Betrachten wir z. B. seinen Versuch 4 (Richter, S. 620): Vor dem Gefrieren produzierte die 48 Stunden alte Pilzdecke in einer Stunde 50,65 mg CO_2, es muß sich hier also um eine ziemlich große Pilzdecke handeln. Nach 24stündiger Einwirkung von nur — 3° C erreichte die Atmungsintensität nach 40 Stunden (bei + 30° C) das Maximum bei nur 7,1 mg CO_2. In Versuch 6 (Richter, S. 621) produzierte die Pilzdecke nach 3 Tagen 16,17 mg CO_2 stündlich, sie war in der Entwicklung gegenüber der anderen in Versuch 4 bedeutend zurück. Diese Kultur wurde 2 Tage einer Temperatur von — 12° C ausgesetzt. Trotz dieser langen Kälteperiode stieg die Atmungsgröße innerhalb 41 Stunden wieder auf 16,17 mg, nach weiteren 27 Stunden auf 34,32 mg. Hiernach ist anzunehmen[1]), daß in Richters Versuch 4 die Nährstoffe der Kulturflüssigkeit vor dem Gefrieren zum großen Teile vom Pilze veratmet waren. Infolgedessen war die Kälteresistenz des Mycels vermindert und die Atmungsintensität erreichte deshalb nach dem Auftauen nur $^1/_7$ der ursprünglichen Größe. In Versuch 6 dagegen war die Nährlösung durch die langsamere Entwicklung der Pilzdecke nur wenig verändert, die Kälteresistenz und die Zuwachsgeschwindigkeit durch Stoffwechselprodukte nicht gemindert, so daß also die Atmungsgröße sich nach der Kälteperiode verdoppeln konnte. — Die Steigerung der Atmung nach wiederholtem Gefrieren läßt sich in Richters Versuchen wohl so erklären, daß entweder die Nährlösung während der Versuche gewechselt wurde, oder daß dem Mycel von Anfang an größere Mengen von Nährlösung zur Verfügung standen. Wenn allerdings, wie in Versuch 6, nach einer zweiten Abkühlung auf ca. — 80° C (Kältemischung aus Äther und fester Kohlensäure) die Atmungsgröße so beträchtlich über den ursprünglichen Wert hinaus steigt, so läßt sich die Vermutung nicht abweisen, daß an diesem Ergebnisse doch mittlerweile gebildete und nun keimende Sporen einen Anteil haben.

Bei einem neuen Versuche beseitigte ich den schädigenden Einfluß der geänderten Kulturbedingungen dadurch, daß ich 2 Stunden vor dem Gefrieren die verbrauchte Nährlösung durch 50 ccm neue Lösung ersetzte. Bei langsamem Neigen des Erlenmeyer-Kolbens wurde die Nährlösung vorsichtig abgegossen und dann,

1) Leider sind die Daten in Richters kurzer Mitteilung so unzureichend, daß man auf Vermutungen angewiesen ist. Weder die Größe der Kulturgefäße, noch die Menge der Nährlösung, noch der Gehalt der Nährlösung an organischer Substanz sind angegeben.

ohne daß die Oberseite der Pilzdecke benetzt wurde, frische Lösung an der Gefäßwandung herab eingelassen. In den 2 Stunden bis zur Kälteperiode konnte der Pilz auch den ursprünglichen Zustand der Kälteresistenz wieder erlangen.

Wenn also dafür gesorgt ist, daß eine schädigende Anhäufung von Stoffwechselprodukten unterbleibt und der Pilz sich in günstigen

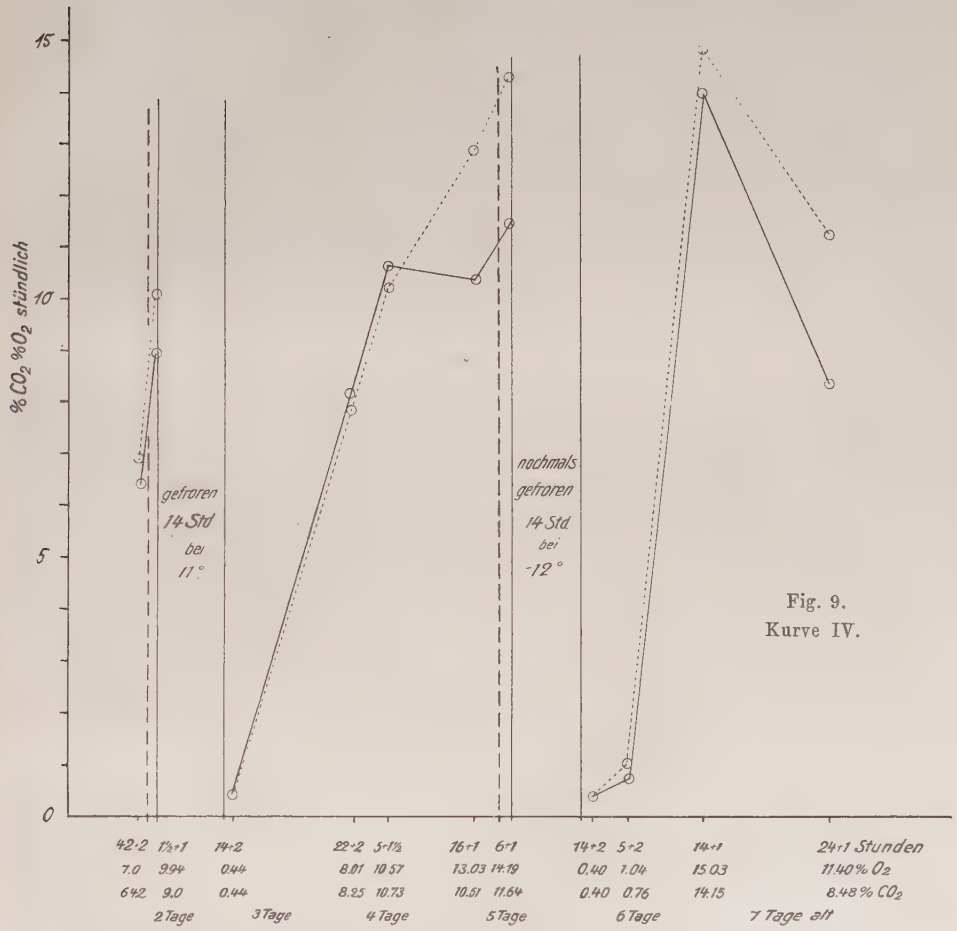

Fig. 9.
Kurve IV.

Ernährungsbedingungen befindet, so muß infolge der erhöhten Zahl an Dauerzellen nach dem Gefrieren der Zuwachs ein beträchtlicher sein. Auch die Atmung wird hierdurch eine entsprechende Steigerung erfahren. Diese Vermutungen wurden durch Versuche bestätigt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Kurven IV und V (Fig. 9 und Fig. 10, S. 48) dargestellt. Die gestrichelte senkrechte Linie

zeigt an, wann den Kulturen neue Nährlösung geboten wurde. Die Wirkung dieser erneuten Zufuhr von Nährstoffen äußert sich schon vor dem Gefrieren in einer beträchtlichen Steigerung der Atmungsintensität, und wir sehen weiter, daß die Atmung auch nach der Kälteperiode schnell zunimmt.

Wenn ich schon vorhin erwähnte, daß eine überlebende Dauerzelle mehr Hyphen bildet als eine Spore, so möchte ich hinzufügen, daß in optimaler Temperatur diese Neubildung sofort einsetzt, während bei der Keimung nachträglich gebildeter Sporen eine gewisse Zeit nötig ist, bevor die Pilzmasseproduktion beginnt. Auch dieser Umstand kann für die schnelle Steigerung der Atmung von Bedeutung sein.

Es fragt sich nun, ob bei allen diesen Versuchen neben der Tätigkeit der Dauerzellen noch andere Faktoren die Zunahme der Atmungsgröße nach dem Gefrieren bewirken.

Da ist vor allem daran zu denken, daß außer den Dauerzellen der submersen Mycelien auch die hier zahlreich vorhandenen Lufthyphen berücksichtigt werden müssen. Die Versuche auf S. 18 lehrten aber, daß die Lufthyphen ganz allgemein resistenter sind als die submers wachsenden und daß sie erst nach lang andauernder Kälte absterben. Es wird also zu den Dauerzellen des Submersmycels noch eine stattliche Zahl von lebensfähigen Zellen des Luftmycels hinzukommen, die ihre Atmungsfähigkeit nach dem Auftauen in vollem Umfange wieder aufnehmen und neue Zellen produzieren können.

Auf die immerhin vorhandene Möglichkeit, daß das Gefrieren auf den Atmungsvorgang der überlebenden Zellen stimulierende Wirkung ausüben kann, soll hier kein großes Gewicht gelegt werden, da der Prozentgehalt der überlebenden Zellen, der allein ein begründetes Urteil darüber gestatten könnte, nicht bekannt ist.

Schließlich muß berücksichtigt werden, daß auch in abgetöteten Pflanzenzellen die CO_2-Ausscheidung noch für gewisse Zeit fortdauern kann. Auf einzelne Ergebnisse diesbezüglicher Untersuchungen einzugehen, würde hier zu weit führen. Es seien nur einige Autoren hier angeführt: Brenstein (1887), Krasnosselsky (1905), Palladin (1906), Nabokich (1908). Ihre Untersuchungen haben z. T. das Ergebnis, daß die Tätigkeit der Atmungsenzyme in getöteten Zellen nicht erlischt; vielmehr erfährt die Atmung bei gewissen Versuchsanstellungen oft unmittelbar nach dem Abtöten eine Steigerung über die ursprüngliche Intensität hinaus. Nach

Palladin (1906, S. 425) atmeten z. B. lebende Erbsensamen vor der Kältewirkung stündlich 3,8 mg CO_2 aus, nach dem Gefrieren dagegen 4,4, 4,5, 3,6, 3,4 mg. „Hieraus folgt, daß die Tätigkeit der Atmungsenzyme im lebenden Organismus durch die Anforderungen des Organismus reguliert wird. Diese Regulierung hört mit dem Tode der Pflanze auf, und deshalb beginnen die Atmungsenzyme in den ersten Stunden nach dem Tode stärker zu arbeiten als im Leben“ (S. 436).

Da die Enzyme abgetöteter Zellen in günstigen Temperaturen sogleich voll wirken, so müßte in unserem Falle die CO_2-Produktion schon unmittelbar nach dem Auftauen beträchtlicher sein, als dies in Wirklichkeit der Fall ist. Die postmortale Enzymwirkung dürfte also bei der CO_2-Abgabe in unseren Versuchen mit *Aspergillus niger* keine Rolle spielen.

Unter Berücksichtigung aller dieser Gesichtspunkte sind mir auch Richters Beobachtungsresultate verständlich. Wir sehen aber, daß durchaus nicht alle Zellen „wieder aufleben“ müssen, um die Atmungssteigerung zu bewirken.

Die Kurven IV und V (Fig. 9 und 10) sind in ihrem ersten Teile identisch. Ich benutzte diese Kulturen noch, um die Frage zu erörtern, wie diese Pilzdecken ein zweites Gefrieren aushalten. Zu der Zeit, als ich ein zweites Mal die Kälte einwirken lassen wollte, war die Nährlösung schon wieder ziemlich erschöpft, die Kälteresistenz des Mycels also auch geringer. Ich erneuerte deshalb in Kultur IV die Nährlösung vor dem zweiten Gefrieren. Das Ergebnis ist aus der Kurve IV (Fig. 9, S. 45) ersichtlich. Die Kurve steigt nach dem zweiten Gefrieren schnell, sogar über die ursprüngliche Intensität hinaus. — Wenn ich hier auf frühere Versuche zurückgreife, so möchte ich daran erinnern, daß nach Tabelle V (S. 27) kurz aufeinander folgendes Gefrieren (innerhalb 17 Stunden) nicht ertragen wurde. Der Anstieg der Kurve IV ist aber unter der Berücksichtigung zu verstehen, daß in dem größeren Zeitraume zwischen den beiden Kälteperioden dem Pilze Gelegenheit geboten ist, ein neues Mycel zu bilden, das wiederum eine große Zahl — ich möchte sagen sekundäre Dauerzellen — besitzt, die ihrerseits für das Weiterbestehen des Pilzes sorgen.

In Versuch 5 (Fig. 10, Kurve V, S. 48) wurde die Methode dahin geändert, daß ich die Kultur das zweite Mal ohne vorher-

gehenden Wechsel der Nährlösung gefrieren ließ. Die Kohlensäureproduktion geht nach der Kältewirkung auf kaum nachweisbare Mengen zurück (vgl. Kurve III, Fig. 8, S. 42). Nun wurde dem Mycel neue Nährlösung geboten. Die Atmungsgröße nimmt auch jetzt noch zu, aber sie erreicht nicht den Wert der Intensität vor dem Gefrieren. Dieser letzte Versuch unterstützt die Vermutung,

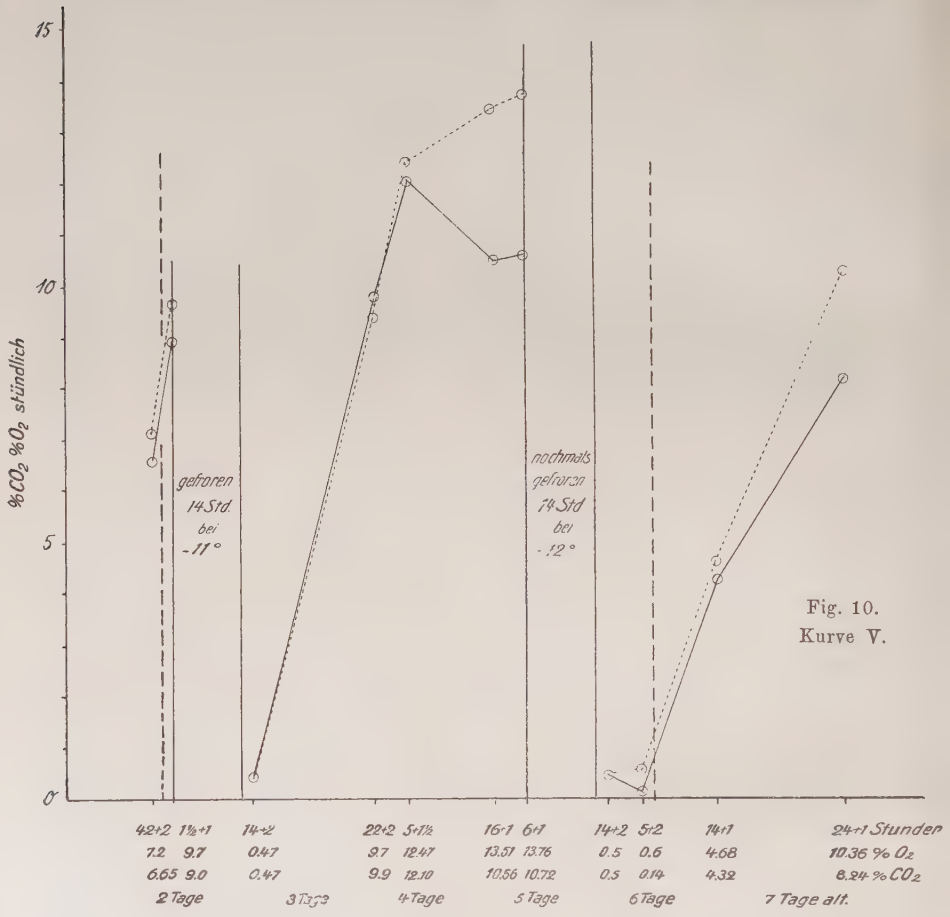

Fig. 10.
Kurve V.

daß die Pilzzellen vor der zweiten Kältewirkung durch die verbrauchte Nährlösung minder resistent geworden sind und nun in geringerer Zahl die Wachstums- und Atmungstätigkeit wieder aufnehmen. Ferner lehrt der Versuch, daß das Weiterleben einzelner Zellen nicht nur von der geeigneten Temperatur, sondern auch von reichlicher Nährstoffzufuhr abhängt.

Hatten die Untersuchungen des I. Teiles gezeigt, daß nur einzelne Dauerzellen ihre Lebenstätigkeit nach dem Gefrieren wieder aufnehmen können, während die in den meisten Pilzzellen eingetretenen Konfigurationsänderungen sicher irreparabel sind, so geht aus dem II Teile der Arbeit hervor, daß sich die Wiederaufnahme der Atmung ganz ungezwungen aus der Weiterentwicklung von „Dauerzellen“ und resistenten Lufthyphen, in einzelnen Fällen auch aus dem nachträglichen Auskeimen von Sporen, die während der Beobachtungszeit neu gebildet worden waren, erklären läßt. Die Steigerung der Atmungsintensität nach der Kälteperiode ist also keineswegs so überraschend, wie sie Richter hinstellt.

Zusammenfassung einiger Ergebnisse.

1. Die Zellen submerser Mycelien von *Aspergillus niger*, ebenso von *Penicillium glaucum* sind verschieden kälteresistent. Die Widerstandsfähigkeit nimmt für die untersuchte Entwicklungsdauer von 24—48 Stunden mit dem Alter zu. Nach der Kältewirkung sterben zuerst die Spitzen- und die angrenzenden Zellen ab. Die resistentesten Zellen finden sich, einzeln oder in Gruppen vereinigt, in der basalen Zone.

2. Die durch die Kältewirkung hervorgerufenen Desorganisationserscheinungen des protoplasmatischen Inhaltes schreiten nach dem Erwärmen der Kultur fort.

3. Die Desorganisation tritt ebenso nach Unterkühlung ein wie nach Eisbildung; in letztem Falle nur schneller. Die Dauer der Kältewirkung hat einen wichtigen Einfluß auf das Eintreten des Kältetodes. (Unter Kältetod wird sowohl schnelles als auch langsames Absterben verstanden.)

4. Lufthyphen sind allgemein resistenter als untergetauchte Zellen.

5. Zellen, die nach dem Auftauen sich nicht plasmolysieren lassen, sind stets tot; der Kollaps des Protoplasten tritt aber oft erst nachträglich ein. Zellen, die plasmolysierbar sind, können weiter leben oder absterben, je nach dem Grade der erlittenen Schädigung.

6. Der Kollaps, das sichtbare Schrumpfen des Protoplasten, kann nicht ausgeglichen werden. Er ist ein Zeichen des Turgor-

verlustes und des damit verbundenen Todes. Ein vorübergehender Verlust des Turgors im Sinne Richters wurde nicht beobachtet.

7. Einfluß günstiger Temperatur bewirkt, daß einzelne der in Punkt 1 genannten resistenten Zellen die Lebenstätigkeit nach dem Gefrieren wieder aufnehmen. Die günstige Temperatur braucht nicht unmittelbar nach der Kälte einzuwirken. Die Lebensdauer der resistenten Zellen in ungünstiger Temperatur (+ 4° C) ist um so kürzer, je größer die vorhergegangene Schädigung war.

8. Der Umstand, daß die resistenteren Zellen in günstiger Temperatur besser am Leben bleiben, beweist, daß diese Zellen unmittelbar nach dem Gefrieren sich in einem Schwächezustande befinden. Dieser Schwächezustand kann eben überwunden werden, wenn die Schädigung nicht zu weit fortgeschritten war.

9. Von den Zellen, die unmittelbar nach der Kältewirkung plasmolysierbar sind, sterben auch in günstiger Temperatur noch einige ab (vgl. Punkt 5). Sie haben also eine Schädigung oder Schwächung erfahren, die auch unter den optimalen Bedingungen reparabel ist.

10. Für eine bestimmte Zelle, die unmittelbar nach der Kältewirkung noch Lebensäußerung zeigt (plasmolysierbar ist usw.), kann deshalb nicht sofort mit Sicherheit entschieden werden, ob sie weiter leben wird.

---

11. Für die Atmungsbeobachtungen wurde das *Aspergillus*-Mycel als Pilzdecke kultiviert. Nur die Randzellen der Decke konnten mikroskopisch beobachtet werden. „Dauerzellen“ waren auch hier nach der Gefrierzeit vorhanden.

12. Überlebende Zellen bilden nach der Kälteperiode eine neue Decke auf der ursprünglichen.

13. Die Atmungstätigkeit wird nach dem Auftauen im Mycel wieder aufgenommen.

14. Die schnelle Zunahme der Atmungsgröße nach der Kältewirkung wird vermutlich bewirkt: a) durch die „Dauerzellen“, b) durch überlebende Lufthyphen, c) durch von beiden neu gebildete Hyphen.

15. Außer günstiger Temperatur sind gute Ernährungsbedingungen vorteilhaft für das Weiterwachsen der „Dauerzellen“ und Lufthyphen und damit auch für die Erhöhung der Atmungsintensität.

16. Anhäufung von Stoffwechselprodukten kann eine Verminderung der Kälteresistenz zur Folge haben, was sich in einem geringeren Anstieg der Atmungskurve kundgibt.

17. Den Atmungsanstieg nach dem Gefrieren im Sinne Richters zu deuten liegt kein Grund vor.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Botanischen Institute der Universität Leipzig ausgeführt. Auch an dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geheimen Rat Professor Dr. Pfeffer herzlichst danken für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine wohlwollende Unterstützung, die mir ständig zuteil wurde. Ebenso bin ich Herrn Privatdozenten Dr. Buder für seine Bemühungen zu bestem Danke verpflichtet.

Literatur-Verzeichnis.

Apelt, Neue Untersuchungen über den Kältetod der Kartoffel. Cohns Beiträge zur Biologie d. Pflanzen, 1909, Bd. 9, S. 215.

Bartetzko, Untersuchungen über das Erfrieren von Schimmelpilzen. Jahrb. f. wiss. Bot., 1910, Bd. XLVII, S. 57.

Bonnier et Mangin, Recherches sur la respiration et la transpiration des champignons. Ann. d. scienc. nat., 1884, VI. sér., vol. 17, p. 210.

— —, Recherches sur la respiration des tissus sans chlorophylle. Ann. d. scienc. nat., 1884, VI. sér., vol. 18, p. 293.

Brenstein, Über die Produktion von CO_2 durch abgetötete Pflanzenteile. Dissertation. Kiel 1887.

Fischer, A., Beiträge zur Physiologie der Holzgewächse. Jahrb. f. wiss. Bot., 1891, Bd. XXII, S. 73.

Göppert, Wärmeentwicklung in den Pflanzen. Breslau 1830.

Haberlandt, Schutzeinrichtungen der Keimpflanzen. Wien 1877.

Irmscher, Über die Resistenz der Laubmoose gegen Austrocknen und Kälte. Jahrb. f. wiss. Bot., 1912, Bd. L, S. 387.

Klebs, Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, Bd. XXXV, S. 80.

Klemm, Desorganisationserscheinungen der Zelle. Jahrb. f. wiss. Bot., 1895, Bd. XXVIII, S. 627.

Krasnosselsky, Bildung der Atmungsenzyme in verletzten Pflanzen. Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch., 1905, Bd. 23, S. 142.

Kühne, Untersuchungen über das Protoplasma und die Kontraktilität. Leipzig 1864.

Kunstmann, Über das Verhältnis zwischen Pilzernte und verbrauchter Nahrung. Dissertation. Leipzig 1895.

Lidforss, Die wintergrüne Flora. Lund 1907.

Loew, Über den verschiedenen Resistenzgrad im Protoplasma. Pflügers Archiv f. Physiol., 1885, Bd. 35, S. 515.

Maximow, Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen das Erfrieren. Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch., 1912, Bd. 30, S. 52—66, 293—304, 504—516.

— —, Experimentelle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot., 1914, Bd. LIII, S. 327.

Mez, Neue Untersuchungen über das Erfrieren eisbeständiger Pflanzen. Flora, 1905, Bd. 94, S. 89.

Molisch, Das Erfrieren von Pflanzen bei Temperaturen über dem Eispunkte. Ber. d. Kaiserl. Akad. d. Wiss. zu Wien, math.-nat. Klasse, 1896, Bd. 105, Abt. I, S. 82.

— —, Untersuchungen über das Gefrieren von Pflanzen. Jena 1897.

Müller-Thurgau, Über das Gefrieren und Erfrieren von Pflanzen. Landw. Jahrb., 1880, Bd. 9, S. 134; 1886, Bd. 15, S. 453.

— —, Über Zuckeranhäufung in Pflanzenteilen infolge niedriger Temperatur. Landw. Jahrb., 1882, Bd. 11, S. 751.

Nabokich, Über die Ausscheidung von CO_2 aus toten Pflanzenteilen. Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch., 1908, Bd. 26a, S. 324.

Noack, Beiträge zur Biologie der thermophilen Organismen. Jahrb. f. wiss. Bot., 1912, Bd. LI, S. 593.

Palladin, Die Arbeit der Atmungsenzyme der Pflanzen unter verschiedenen Verhältnissen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1906, Bd. 47, S. 407.

Pantanelli, Zur Kenntnis der Turgorregulationen bei Schimmelpilzen. Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, Bd. XL, S. 303.

Pfeffer, Pflanzen-Physiologie, 2. Aufl., Bd. II, Leipzig 1904.

Puriewitsch, Physiologische Untersuchungen über Pflanzenatmung. Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, Bd. XXXV, S. 573.

Raciborski, Einige Chemomorphosen des *Aspergillus niger*. Bulletin de l'acad. des scienc. de Cracovie, 1906, S. 764.

Rein, Untersuchungen über den Kältetod der Pflanzen. Zeitschr. f. Naturwiss., 1908, Bd. 80, S. 1.

Richter, A., Zur Frage über den Tod von Pflanzen infolge niedriger Temperatur. (Kälteresistenz von *Aspergillus niger*.) Zentralbl. f. Bakteriol., II. Abt., 1910, Bd. 28, S. 617.

Ritter, Über Kugelhefe und Riesenzellen bei einigen Mucoraceen. Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch., 1907, Bd. 25, S. 262.

Schaffnit, Studien über den Einfluß niederer Temperatur auf die pflanzliche Zelle. Mitteil. d. Kaiser Wilhelm-Institutes f. Landwirtschaft, Bromberg 1910, Bd. III, S. 143.

Schmidt, G., Über die Atmung ein- und mehrjähriger Blätter im Sommer und im Winter. Dissertation. Leipzig 1902.

Schumacher, Beiträge zur Morphologie und Biologie der Hefe. Ber. d. Kaiserl. Akad. d. Wiss. zu Wien, math.-nat. Klasse, 1874, Bd. 70, Abt. I, S. 157.

Thoday, On the capillary eudiometric apparat. Ann. of Botany 1913, Bd. 27, S. 567.

Voigtländer, Unterkühlung und Kältetod der Pflanzen. Cohns Beiträge z. Biologie d. Pflanzen, 1909, Bd. 9, S. 359.

Wehmer, Über den Einfluß der Temperatur auf die Entstehung freier Oxalsäure in Kulturen von *Aspergillus niger*. Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch., 1891, Bd. 9, S. 164.

Winkler, Albert, Über den Einfluß der Außenbedingungen auf die Kälteresistenz ausdauernder Gewächse. Jahrb. f. wiss Bot., 1913, Bd. LI, S. 467.

Lebenslauf.

Als Sohn des Postsekretärs Max Lindner wurde ich, Johannes Arthur Ottokar Lindner, am 13. März 1891 zu Altenburg (Sachs.-Alt.) geboren. Ich erhielt meine Elementarbildung in der I. Bürgerschule und bezog 1901 das Herzogliche Ernst-Realgymnasium zu Altenburg, das ich Ostern 1910 mit dem Zeugnis der Reife verließ. In demselben Jahre erfolgte meine Immatrikulation an der Universität Berlin, die ich zwei Semester zum Studium der Naturwissenschaften besuchte. 1911 setzte ich diese Studien an der Universität Leipzig fort.

Ich besuchte die Vorlesungen und Praktika der Herren Dozenten:

in Berlin:

Ascherson, Byk, O. Diels, Ficker, Frischeisen-Köhler, Haberlandt, Lehmann-Filhés, Nicolai, Reinhardt, Rubens, Adolf Schmidt, F. E. Schulze, Schur;

in Leipzig:

Barth, Le Blanc, Böttger, Buder, Chun, Eulenburg, Hantzsch, Held, Jungmann, Miehe, Pfeffer, Rinne, Schreiber, Sieglbauer, Spalteholz, Spranger, Volkelt, Waentig, Wagner, Wiener, Woltereck, Wundt.

Ich bin evang.-luth.